



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

RENATO HERDINA ERDMANN

**EXAME REPRODUTIVO, CONTENÇÃO FARMACOLOGICA E
CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN EM GATO-DO-MATO-PEQUENO (*Leopardus
tigrinus* Schreber, 1775)**

**CURITIBA
2005**

RENATO HERDINA ERDMANN

**EXAME REPRODUTIVO, CONTENÇÃO FARMACOLOGICA E
CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN EM GATO-DO-MATO-PEQUENO (*Leopardus
tigrinus* Schreber, 1775)**

**Dissertação apresentada como
requisito parcial à obtenção do grau de
Mestre em Ciências Veterinárias, Curso
de Pós-Graduação em Ciências
Veterinárias, Setor de Ciências
Agrárias, Universidade Federal do
Paraná.**

Orientador: Prof. Dr. Nei Moreira

**CURITIBA
2005**

Dedicatória

A Deus, que nos deu sua graça.

AGRADECIMENTOS

A Marilis, William e Jamile, que, pelo apoio, tranquilidade e amor do lar, foi permitida esta empreitada.

A Nei Moreira, pela orientação, ensinamentos, dedicação e amizade, com que foi conduzido este trabalho.

Aos meus pais, Arthur e Zailde, pelo amor sempre dedicado, desde cedo incentivaram esta atividade.

A Kátia, Bini e D'Artagnan, amigos, disponibilizando apoio logístico fundamental.

Aos estagiários, que mais ensinaram que aprenderam, Anderson, Samira, Adriano, Sandra.

Ao Julio Cezar Juvenal pelo companheirismo, amizade e apoio logístico, ah! E também pelas anestésias.

Ao Wanderlei, Patrícia, Marcos, Cassiana e Antonio, profissionais comprometidos, deram apoio e suporte técnico a esta pesquisa.

Ao Rodrigo, amigo e colega de trabalho, que socorreu as outras atividades para que pudéssemos realizar esta.

Aos colegas da Clínica Veterinária Santa Clara, que compreenderam e auxiliaram as atividades.

A todos os colegas da PUC, Alvet e FAG, que, direta ou indiretamente participaram deste período.

À Alvet, por disponibilizar exames laboratoriais que fossem necessários.

À empresa Tetakon, de Uberaba-MG, que gentilmente emprestou o equipamento TK-3000, para os testes de criopreservação de sêmen.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

À ITAIPU, que disponibilizou o objeto de pesquisa.

À Selva Paranaense, diretoria e colaboradores, entidade que fundamentou os ensinamentos da importância da conservação das espécies.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	viii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xi
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
1 INTRODUÇÃO	01
2 REVISÃO DA LITERATURA	03
2.1 CONSERVAÇÃO DAS ESPÉCIES	03
2.2 GATO DOMÉSTICO COMO MODELO DE ESTUDO	06
2.3 FISIOLOGIA E MANEJO REPRODUTIVO.....	07
2.4 COLHEITA DE SÊMEN.....	09
2.5 PROTOCOLOS ANESTÉSICOS.....	10
2.6 ACONDICIONAMENTO E ANÁLISE DE SÊMEN DE FELÍDEOS.....	12
2.7 CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE FELÍDEOS	16
2.8 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	21
3 OBJETIVOS.....	23
3.1 OBJETIVO GERAL.....	23
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
4 MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1 LOCAL E PERÍODO.....	24
4.2 ANIMAIS E RECINTOS.....	25
4.3 CONTENÇÃO FÍSICA	26
4.4 CONTENÇÃO FARMACOLÓGICA	26
4.5 EXAME CLÍNICO E LABORATORIAL.....	27
4.6 EXAME ANDROLÓGICO	28
4.6.1 Avaliação da Genitália Externa.....	28
4.6.2 Colheita de Sêmen	28

4.6.3	Avaliação do Sêmen.....	30
4.7	PROCESSAMENTO E CONGELAMENTO DO SÊMEN.....	32
4.8	CURVAS DE RESFRIAMENTO E CONGELAMENTO	34
4.9	ANÁLISE DAS AMOSTRAS PÓS-CONGELAMENTO.....	35
4.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA	45
5	RESULTADO E DISCUSSÃO DO EXPERIMENTO 1 - CONTENÇÃO QUÍMICA PARA COLHEITA DE SÊMEN EM GATO-DO-MATO-PEQUENO (<i>Leopardus tigrinus</i>).....	37
6	RESULTADO E DISCUSSÃO DO EXPERIMENTO 2 - ANÁLISE DESCRITIVA EXPLORATÓRIA DE PARÂMETROS CLÍNICOS E ANDROLÓGICOS DE GATO-DO-MATO-PEQUENO (<i>Leopardus tigrinus</i>)	44
6.1	EXAME CLÍNICO	44
6.1.1	Peso Corporal.....	44
6.1.2	Exame Clínico	45
6.1.3	Hematologia	46
6.2	EXAME ANDROLÓGICO	47
6.2.1	Exame Externo	47
6.2.2	Ejaculado.....	49
7	RESULTADO E DISCUSSÃO DO EXPERIMENTO 3 - CONGELAMENTO DE SÊMEN EM GATO-DO-MATO-PEQUENO (<i>Leopardus tigrinus</i>)	56
	CONCLUSÕES	63
	REFERÊNCIAS	64

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - LOCAIS DE REGISTRO DE OCORRÊNCIA DE <i>Leopardus tigrinus</i> NO ESTADO DO PARANÁ.....	04
TABELA 1 - PARÂMETROS SEMINAIS EM GATO DOMÉSTICO	15
TABELA 2 - VALORES DE PESO, VOLUME TESTICULAR E CARACTERÍSTICAS DE SÊMEN EM MACHOS DE JAGUATIRICA (N=3), GATO-MARACAJÁ (N=3) E GATO-DO-MATO-PEQUENO (N=4)	18
TABELA 3 - COMPOSIÇÃO DOS MEIOS “UPPSALA EQUEx”	18
QUADRO 1 - IDENTIFICAÇÃO DOS ANIMAIS E PESO MÉDIO.....	26
FIGURA 2 - EQUIPAMENTO DE ELETROEJACULAÇÃO (PT ELECTRONICS, MODELO 303, EUA).....	28
FIGURA 3 - COLHEITA DE SÊMEN EM GATO-DO-MATO-PEQUENO (<i>Leopardus tigrinus</i>).....	30
TABELA 4 - COMPOSIÇÃO DO MEIO EXTENSOR “REFRIGERATION MEDIUM” – TEST YOLK BUFFER® (IRVINE SCIENTIFIC, SANTA ANA, CA, EUA) – (TYB-R)	32
TABELA 5 - COMPOSIÇÃO DO MEIO EXTENSOR “FREEZING MEDIUM” TEST YOLK BUFFER® (IRVINE SCIENTIFIC, SANTA ANA, CA, EUA) – (TYB-F)	33
TABELA 6 - COMPOSIÇÃO DO MEIO EXTENSOR BIOXCELL® (IMV TECHNOLOGIES, L’AIGLE, FRANÇA) - (BIOXCEL)	33
FIGURA 4 - EQUIPAMENTO DE CONGELAÇÃO DE SÊMEN TK-3000®.....	35
GRÁFICO - 1 TEMPOS MÉDIOS DE INDUÇÃO ANESTÉSICA E TÉRMINO DE ANESTESIA UTILIZANDO TRÊS PROTOCOLOS (P1, P2 E P3) COM DIFERENTES DOSAGENS DE FÁRMACOS.....	38
GRÁFICO - 2 SENSIBILIDADE DOLOROSA DO MEMBRO TORÁCICO AO	

LONGO DO TEMPO	39
GRÁFICO - 3 TEMPERATURA MÉDIA NAS ETAPAS DO PROCEDIMENTO DE ELETROEJACULAÇÃO EM P1, P2 E P3	40
GRÁFICO - 4 MÉDIA DE FREQUÊNCIAS RESPIRATÓRIAS EM P1, P2 E P3	41
GRÁFICO - 5 MÉDIA DAS FREQUÊNCIAS CARDÍACAS EM P1, P2 E P3	41
GRÁFICO - 6 VARIAÇÃO DE PESO DOS ANIMAIS DURANTE O EXPERIMENTO	45
TABELA 7 - VALORES HEMATOLÓGICOS ENCONTRADOS EM GATO-DO- MATO-PEQUENO (<i>Leopardus tigrinus</i> , n=20/2*)	47
TABELA 8 - MÉDIAS (\pm EPM) DO VOLUME DO EJACULADO (VOL), CONCENTRAÇÃO ESPERMÁTICA (CONC.), TOTAL DE ESPERMATOZÓIDES POR EJACULADO (TOTAL SP) E NÚMERO DE CÉLULAS VIÁVEIS POR EJACULADO (VIÁVEIS)	50
TABELA 9 - MÉDIAS (\pm EPM) DE PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS ENCONTRADOS NO SÊMEN DE GATO-DO-MATO-PEQUENO (<i>Leopardus tigrinus</i> , n=11)	52
TABELA 10 - MORFOLOGIA ESPERMÁTICA EM GATO-DO-MATO- PEQUENO (<i>Leopardus tigrinus</i>), MÉDIA (\pm EPM) RESULTANTE DE 33 AMOSTRAS PROVENIENTES DE 12 ANIMAIS	54
GRÁFICO - 7 MOTILIDADE ESPERMÁTICA PÓS-DESCONGELAMENTO	57
GRÁFICO - 8 ÍNDICE DE MOTILIDADE PROGRESSIVA (IMP) NOS MOMENTOS <i>IN NATURA</i> , RESFRIADO E DESCONGELADO, DAS CURVAS TESTADAS RAP (20°C A 5°C EM 60MIN.; ESTABILIZAÇÃO EM 5°C POR 150 MIN E 5 À -196°C EM 3 MIN), TEB (20°C A 5°C EM 60 MIN; ESTABILIZAÇÃO EM 5°C POR 150 MIN E 5°C À -196°C EM 20 MIN.) E TK (20°C A 5°C EM 60 MIN.; ESTABILIZAÇÃO EM 5°C POR 90 MIN; 5 A -120°C EM 6,25 MIN E -196°C EM 1 MIN)	57

GRÁFICO - 9	PERCENTUAL DE QUEDA DO IMP ENTRE OS DILUENTES TYB E BIOX.....	58
GRÁFICO - 10	PERCENTUAL DE QUEDA DO IMP ENTRE AS CURVAS DE CONGELAMENTO RAP,TEB E TK	59
GRÁFICO - 11	MOTILIDADE PROGRESSIVA ESPERMÁTICA EM PERCENTUAL, DAS AMOSTRAS DESCONGELADAS PARA AS ASSOCIAÇÕES BIOX-RAP, BIOX-TEB, BIOX-TK, TYB- TEB E TYB-TK.....	60
GRÁFICO - 12	VIGOR ESPERMÁTICO DAS AMOSTRAS DESCONGELADAS PARA AS ASSOCIAÇÕES BIOX-RAP, BIOX-TEB, BIOX-TK, TYB-TEB E TYB-TK.....	60
GRÁFICO - 13	ÍNDICE DE MOTILIDADE PROGRESSIVA (IMP) DAS AMOSTRAS DESCONGELADAS PARA AS ASSOCIAÇÕES BIOX-RAP, BIOX-TEB, BIOX-TK, TYB-TEB E TYB-TK.....	61
TABELA 11 -	ÍNDICE DE MOTILIDADE PROGRESSIVA (IMP) PÓS- CONGELAMENTO POR AVALIAÇÃO INDIVIDUAL	61

LISTA DE ABREVIATURAS E LISTA DE SIGLAS

μg – micrograma.

μL – microlitro.

ALP – alanina-aminotranferase.

BIOX – Bioxcell - diluente de sêmen para criopreservação.

bpm – batimentos por minuto.

C – comprimento testicular

CASIB – Criadouro de Animais Silvestres da Itaipu Binacional.

CBRA – Colégio Brasileiro de Reprodução Animal.

cm^3 – centímetros cúbicos.

Conc. – concentração

CV – coeficiente de variação.

DMSO – dimetil-sulfóxido

DP – desvio padrão.

EPM – erro padrão da média.

FDA – Food and Drugs Administration.

FR – frequência respiratória.

G – mensuração de força.

g – grama.

GMP – Gato-do-mato-pequeno.

Ham's F 10 – meio de cultura celular.

hCG – gonadotropina coriônica humana.

Hz – Hertz.

IA – inseminação artificial

IAP – Instituto Ambiental do Paraná

ICSI – injeção intracitoplasmática de espermatozóide

IM – intra-muscular.

IME – índice de motilidade espermática.

IMP – índice de motilidade progressiva.

IVF – fertilização *in vitro*.

Kg – quilograma

L – largura testicular

M – molar.

mg – miligrama.

min – minuto.

mKRB – bicarbonato Krebs-Ringer

ml – mililitro.

mM – milimolar.

mOsm – miliosmol.

mot – motilidade.

MP-50 – diluente de sêmen para criopreservação.

n – número.

°C – graus Celcius.

p – nível de significância.

P1 – protocolo anestésico um.

P2 – protocolo anestésico dois.

P3 – protocolo anestésico três.

PBS – proteína sérica bovina.

pH – potencial de hidrogênio.

r – coeficiente de correlação.

RAP – curva de congelamento chamada rápida.

REP – reação de endireitamento postural.

s – segundo.

SC – subcutâneo.

SNC – sistema nervoso central

SPF – “Specific patogen free”

TEB – curva de congelamento descrita por TEBET (2004).

Tes – N-Trishidroximetil-metil2-aminometano-sulfônico.

TK – curva de congelamento processada no equipamento TK3000.

TK-3000 – equipamento de congelação de sêmen.

Tris – Trishidroximetil-aminometano

TYB – “TEST Yolk buffer.” - diluente de sêmen para criopreservação.

TYB-f – “Freezing Medium - Test Yolk Buffer”.

TYB-r – “Refrigeration Medium – Test Yolk Buffer”.

UFPR – Universidade Federal do Paraná

UI – Unidades internacionais.

V – Volts

Vol. – volume.

VT– volume testicular

VTT – volume testicular total.

x – vezes (multiplicador).

% - por cento

α - alfa.

< - menor que.

> - maior que.

= - igual.

\pm - mais ou menos.

EXAME REPRODUTIVO, CONTENÇÃO FARMACOLOGICA E CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN EM GATO-DO-MATO-PEQUENO (*Leopardus tigrinus* Schreber, 1775)

RESUMO: Uma melhor compreensão da fisiologia reprodutiva dos pequenos felídeos neotropicais é necessária para obter-se um desempenho reprodutivo mais consistente em cativeiro e para que técnicas de reprodução assistida possam ser utilizadas. O objetivo deste trabalho foi descrever parâmetros andrológicos de *Leopardus tigrinus*, avaliar protocolo anestésico com três dosagens distintas para colheita de sêmen e testar protocolos de criopreservação de sêmen. Foram realizadas 32 colheitas de sêmen em gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*, n=11) mantidos em cativeiro no Criadouro de Animais Silvestres da Itaipu Binacional, em Foz do Iguaçu – PR. Os animais estavam alojados em recintos ambientados e eram alimentados com carne bovina, frango, rato, suplemento mineral e vitamínico. O protocolo anestésico utilizado foi o cloridrato de tiletamina/zolazepan na dose de 6,7 mg/kg associado ao cloridrato de xilazina nas doses de 0,67 mg/kg; 0,9 mg/Kg e 1,3 mg/kg, sendo que todas foram eficazes e seguras para colheita de sêmen. Houve, entretanto, necessidade de uso de dose suplementar em nove ocasiões. Os animais foram submetidos à colheita de sêmen pelo método de eletroejaculação descrito por Howard (1986) composto por 8 séries de 10 estímulos, variando a intensidade de 2 a 5 Volts. Houve contaminação por urina em 10 colheitas (31,2%) e em 18 alíquotas (0,07%) , sendo possível desprezar as alíquotas contaminadas, com aproveitamento do restante da amostra. Os resultados obtidos foram os seguintes (média \pm erro padrão da média): volume $0,13 \pm 0,20$ ml; motilidade $73,44 \pm 3,71\%$; vigor $3,48 \pm 0,11$; pH $7,58 \pm 0,07$; concentração espermática $436,41 \pm 95,81 \times 10^6$ espermatozóides/ml; espermatozóides morfolologicamente normais $55,86 \pm 3,34\%$. Os ejaculados que apresentaram uma concentração de espermatozóides acima de 20×10^6 /ml e motilidade acima de 60% (n=24), foram submetidos aos protocolos de criopreservação envolvendo dois diluentes, o BIOXCELL (IMV Technologies, L'Aigle, França) e o TYB (Irvine Scientific, Santa Ana, CA, EUA). Foram testadas três curvas de criopreservação, uma rápida (RAP), uma descrita por TEBET (2004) (TEB) e outra realizada pelo equipamento de criopreservação seminal TK-3000 (TK). O congelamento de sêmen demonstrou que é possível o uso dos dois diluentes, com melhores resultados para o TYB ($p < 0,10$). As curvas de criopreservação apresentaram resultados similares ($p > 0,10$). Os resultados obtidos demonstraram que o protocolo anestésico utilizado foi eficaz para as colheitas de sêmen, que o índice de teratospermia nesta espécie é alto (44,14%) e que os diluentes Bioxcell e TYB, com os protocolos descritos de criopreservação, de sêmen podem ser utilizados em gato-do-mato-pequeno.

Palavras-Chave: Sêmen, *Leopardus tigrinus*, anestesia, gato-do-mato-pequeno, felídeos.

REPRODUCTIVE EVALUATION, ANAESTHESIA AND SEMEN CRYOPRESERVATION IN TIGRINA (*Leopardus tigrinus* Schreber, 1775)

ABSTRACT: A better understanding of small neotropical felid reproductive physiology is necessary to get a more consistent reproductive performance in captivity and to get a higher success rate assisted reproduction techniques. The aim of this work was to describe in *Leopardus tigrinus* andrological parameters, evaluate anesthetic protocol with three dosages for semen collection and evaluate semen cryopreservation protocols. Thirty-two semen samples were collected from small wild cats (*Leopardus tigrinus*, n=11) maintained in captivity at the "Wildlife Breeding Itaipu Binational," in city Foz do Iguaçu, Paraná state. The animals were kept in enriched enclosures and fed with beef, chicken and rat, supplemented with vitamins and minerals. As anesthetic protocol with tiletamine /zolazepam was used in a dosage of 6.7mg/kg associated to xilazina at a dosage of 0.67 mg/kg; 0.9 mg/kg e 1.3 mg/kg. All administered dosages were safe and effective for the collection of semen. However, it was necessary to use supplementary dosage in nine occasions. Semen collection was done through electro ejaculation method described by Howard (1986) with a series of eight to ten stimulus with intensity varying from 2 to 5 Volts. Urine contamination occurred in ten samples (31.2%), but only in eighteen aliquots (7%). It was possible to discard these aliquots using the remaining samples. Results obtained were as follows (mean \pm standard error of the mean): volume 0.13 ± 0.20 ml; motility $73.44 \pm 3.71\%$; strength 3.48 ± 0.11 ; pH 7.58 ± 0.07 ; sperm concentration $436.41 \pm 95.81 \times 10^6$ sperm/ml; morphologically normal sperm $55.86 \pm 3.34\%$. Ejaculates with sperm concentration above 20×10^6 /ml and motility above 60% (n=24) were submitted to cryopreservation protocol involving two diluents, Bioxcell (IMV Technologies, L'Aigle, France) and TYB (Irvine Scientific, Santa Ana, CA, USA). Three cryopreservation curves were tested. One fast curve (RAP), one described by Tebet (2004) (TEB), and another done through TK-3000 (TK) semen cryopreservation equipment. Semen freezing showed that it is possible to use both diluents. TYB ($p < 0.10$) presented better results. Cryopreservation curves showed similar results ($p > 0.10$). Obtained results showed that the anesthetic protocol utilized was effective for semen collection, the teratospermia percentage in this species is high (44.14%), and that both semen diluents, Bioxcell and TYB can be used in small wild cats with the described cryopreservation protocols.

KEYWORDS: Semen, *Leopardus tigrinus*, feline, anaesthesia, tigrina.



GATO-DO-MATO-PEQUENO (*Leopardus tigrinus*)

1 INTRODUÇÃO

Populações de animais silvestres de todo o planeta têm sofrido ameaças constantes e a consequência direta é o alto número de espécies em extinção. Dentre as causas de extinção, podemos citar a destruição do habitat, a caça para consumo e para venda de produtos derivados, a captura para o tráfico e desequilíbrios ecológicos provocados pela ação do homem.

Podemos atuar na conservação das espécies ameaçadas de duas maneiras principais: com projetos de conservação *in situ* e *ex situ*. A preservação *in situ* envolve estratégias de conservação da população em seu ambiente natural, enquanto a preservação *ex situ* trata da conservação das espécies fora do ambiente natural, em cativeiro (AZEVEDO; YOUNG, 2005).

Os conhecimentos em fisiologia reprodutiva e técnicas de reprodução assistida têm avançado de modo acelerado, possibilitando melhores taxas de nascimento em cativeiro e viabilizando o nascimento de filhotes de espécies ameaçadas de extinção.

Todos os felídeos, com exceção do gato doméstico, estão no momento ameaçados em algum grau; e várias espécies são vistas como criticamente em perigo (NOWELL; JACKSON, 1996).

O gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*) está classificado como vulnerável pela lista da Fauna Silvestre Brasileira Ameaçada de Extinção, publicada pelo Ministério do Meio Ambiente em 2003 (BRASIL, 2005).

A espécie em estudo faz parte de nossa fauna nativa (OLIVEIRA, 1994), assumindo assim este trabalho uma importância regional e global, contribuindo para a formação de um banco de reserva genômica de pequenos felídeos silvestres, com alto valor genético, mantidos em cativeiro na região Oeste do Paraná.

A biotecnologia da reprodução ou reprodução assistida tem um potencial de impacto significativo na conservação de pequenos felídeos selvagens (POPE, 2000). A aplicação desta tecnologia demonstra-se principalmente no uso da inseminação artificial, transferência de embriões, fertilização *in vitro* e criopreservação de gametas (LOPES, 2002).

Não se defende a reprodução artificial em detrimento da natural. Ao contrário, a reprodução assistida só deve ser utilizada como auxiliar ao sistema

convencional de reprodução. No entanto, essas ferramentas podem ser extraordinariamente poderosas e merecem uma séria consideração, especialmente para programas de manejo *ex situ* (WILDT; ROTH, 1997).

Estudos de reprodução animal englobam uma diversidade de áreas que estão inter-relacionadas, incluindo biologia de gametas, embriologia, endocrinologia e criobiologia. Para o uso efetivo de biotecnologias em reprodução assistida nas espécies de felídeos, o estudo e a propagação do conhecimento de novas tecnologias são necessários, pois há variações espécie-específicas que precisam ser consideradas no desenvolvimento de protocolos (SWANSON; BROWN, 2004).

A inseminação artificial (IA) pode ser benéfica para: 1) indivíduos que falham em acasalar-se por incompatibilidade comportamental ou clínica; 2) aumentar a diversidade genética dentro de uma população e expandir o grupo de genes através do acasalamento de indivíduos selecionados; 3) distribuir o sêmen com segurança entre diferentes localizações geográficas sem o risco e o custo de transportar animais vivos (HOWARD et al., 1992).

A criopreservação de gametas viáveis de alta qualidade genética é fundamental para a criação de um banco de reserva genômica e importante para a manutenção do potencial reprodutivo no futuro (modificado de SWANSON et al., 2003).

A importância recentemente assumida da conservação de espécies e de sua diversidade genética, a presença destes animais em cativeiro na região oeste do Paraná, o Termo de Cooperação entre a Universidade Federal do Paraná (UFPR) e a Itaipu Binacional, os trabalhos em conjunto com criadouros e zoológicos regionais que disponibilizam os animais para pesquisa; e a necessidade da aplicação de biotecnologias de reprodução assistida para manutenção da viabilidade genética destes felídeos, justificam esta pesquisa com o enfoque descrito.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CONSERVAÇÃO DAS ESPÉCIES

Jardins zoológicos e outras instituições que fazem reprodução *ex situ* compartilham a grande responsabilidade de ajudar a prevenir a rápida extinção de espécies silvestres no Planeta Terra. Ao menos quatorze espécies que haviam sido extintas na natureza foram salvas através da reprodução em cativeiro (MOREIRA, 2001).

A família *Felidae* é um dos grupos com maior diversidade de carnívoros e inclui espécies que variam em tamanho desde 1 kg até mais de 230 kg (tigre). Esta família compreende um grupo de espécies fenotipicamente díspares que vivem em diversas regiões geográficas. São considerados pequenos felídeos aqueles que na idade adulta pesam menos que 20 kg (EMMONS, apud MOREIRA, 2001).

Felídeos são animais reservados e estão normalmente presentes em baixas densidades populacionais onde quer que eles se encontrem, isto inclui todos os continentes, exceto Austrália, Madagascar e Antártica. A região neotropical é a casa de 10 das 37 espécies presentes no mundo. Elas são a jaguatirica (*Leopardus pardalis*), gato-maracajá (*Leopardus wiedii*), gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*), gato-do-mato-grande (*Oncifelis geofroyi*), gato-chileno (*Felis guigna*), puma (*Puma concolor*), gato-andino (*Felis oreailururs*), gato-mourisco (*Herpailurus yagouaroundi*), gato-palheiro (*Oncifelis colocolo*) e a onça-pintada (*Panthera onca*) (OLIVEIRA, 1994).

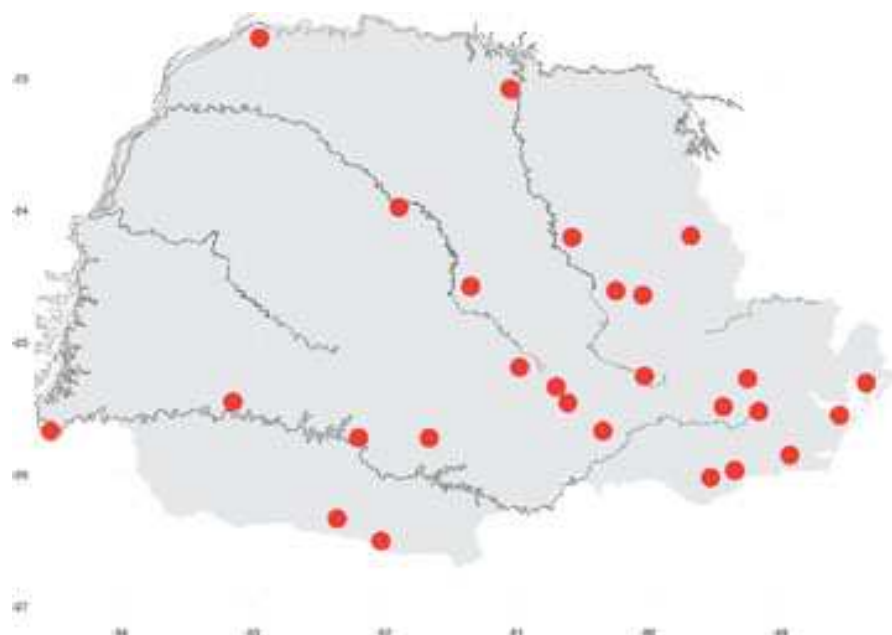
A maioria das 36 espécies de felídeos não-domésticos está ameaçada ou em extinção em pelo menos uma parte de sua área de ocorrência natural, pela fragmentação do habitat, caça e poluição. As espécies que habitam áreas da floresta tropical onde o desmatamento é intenso são particularmente vulneráveis. Nas florestas tropicais brasileiras, a jaguatirica (*Leopardus pardalis*), o gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*), e o gato-maracajá (*Leopardus wiedii*), estão entre os felídeos que lutam para sobreviver diante da destruição do hábitat (MOREIRA et al., 2001).

O gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*) está classificado como

vulnerável pela lista da fauna silvestre brasileira ameaçada de extinção, publicada pelo Ministério do Meio Ambiente no dia 22 de maio de 2003 (BRASIL, 2005).

Como todos os felídeos, esta espécie tem sofrido diminuição de extensão e qualidade de habitat, com declínio populacional. O gato-do-mato-pequeno ocorre em todo o Brasil. No Paraná pode ser encontrado em áreas de floresta estacional semidecidual, floresta ombrófila mista, floresta ombrófila densa, campos naturais e cerrado. Provavelmente ainda ocorre em todo o Estado, sendo classificado como espécie vulnerável pelo Livro Vermelho da Fauna Ameaçada no Estado do Paraná, publicado em 2004 pelo Instituto Ambiental do Paraná (IAP) (PARANÁ, 2005).

FIGURA 1 - LOCAIS DE REGISTRO DE OCORRÊNCIA DE *Leopardus tigrinus* NO ESTADO DO PARANÁ



FONTE: Livro Vermelho – PARANÁ, 2005.

Programas de conservação podem ser realizados através da tecnologia de reprodução assistida, incluindo-se a criopreservação de sêmen, combinada com a IA para facilitar o intercâmbio entre indivíduos mantidos em zoológicos e entre populações cativas e vida livre (WILDT et al., 1992).

Os benefícios da reprodução assistida para o controle da diversidade genética só poderão ser percebidos apenas quando estiverem prontos protocolos eficazes para a indução da ovulação, congelamento de sêmen e inseminação intrauterina (SWANSON et al., 1996a).

Historicamente, os pequenos felídeos sul-americanos têm sido caracterizados por seu baixo desenvolvimento reprodutivo em cativeiro. A porcentagem de nascimentos na população cativa é baixa e o sucesso da reprodução imprevisível. Registros reprodutivos para a população de pequenos felídeos em zoológicos brasileiros mostram que há uma pequena porcentagem de nascimentos, associada à alta taxa de mortalidade nos primeiros 30 dias. Dessa forma, o desempenho reprodutivo não é confiável e as particularidades que envolvem os êxitos e fracassos na reprodução em cativeiro são pouco compreendidas (MOREIRA, 2001).

Embora a função gonadal seja controlada por uma complexa interação de fatores biológicos, as condições precárias nos zoológicos podem ser parcialmente responsáveis pelo baixo índice reprodutivo em animais de cativeiro. Em particular, uma dieta inadequada e um ambiente impróprio (condições físicas e/ou sociais) podem comprometer a reprodução através de mecanismos fisiológicos e/ou comportamentais (MORAIS et al., 1997).

Uma melhor compreensão da fisiologia reprodutiva dos pequenos felídeos neotropicais é necessária para obter-se um desempenho reprodutivo mais consistente em cativeiro, aumentar o número de indivíduos que reproduzem na população e para que técnicas de reprodução assistida (ex.: inseminação artificial, fertilização *in vitro*) sejam aplicadas com maior sucesso (MOREIRA, 2001).

Na última década foram realizados programas de treinamento ministrados por pesquisadores norte-americanos para técnicos latino-americanos, com aplicações de tecnologia reprodutiva em felídeos neotropicais, envolvendo análises endócrinas, colheita de sêmen, criopreservação espermática, inseminação artificial, fertilização *in vitro*, criopreservação de embriões e transferência de embriões (SWANSON; BROWN, 2004).

Dentro da ordem Carnivora, as famílias *Felidae* e *Canidae* possuem vários representantes que estão ameaçados e que poderiam beneficiar-se da biotecnologia. Pouco a pouco, os cientistas estão começando a desvendar os mistérios e montar o quebra-cabeça da reprodução desses predadores severamente perseguidos (GOODROWE et al., 2000).

A criopreservação do sêmen, em conjunto com outras técnicas de reprodução assistida, pode ser benéfica à conservação da diversidade genética de

pequenas populações de felídeos (SWANSON; WILDT, 1997).

Segundo WILDT e ROTH (1997, p. 166):

A inseminação artificial já foi usada para reproduzir o gato-leopardo, *Prionailurus bengalensis* (WILDT et al., 1992), o guepardo, *Acinonyx jubatus* (HOWARD et al., 1992b), o tigre, *Panthera tigris* (DONOGHUE et al., 1993), o puma, *Puma concolor* (BARONE et al., 1994), a jaguatirica, *Leopardus pardalis* (SWANSON et al., 1996), o leopardo-nebuloso, *Neofelis nebulosa* (HOWARD et al., 1996), o gato-do-mato-pequeno, *Leopardus tigrinus* (SWANSON, dados não publicados) e o leopardo-das-neves, *Uncia uncia* (ROTH et al., 1996).

MORAES et al. (1997) descreveram a realização das primeiras inseminações artificiais com sucesso em jaguatirica e gato-do-mato-pequeno na América Latina.

SWANSON et al. (2003) relataram os resultados da colheita de sêmen em 17 machos de gato-do-mato-pequeno em zoológicos latino-americanos, sendo que dessas colheitas, seis amostras foram criopreservadas para formação de um banco de reserva genômica de felídeos latino-americanos.

2.2 GATO DOMÉSTICO COMO MODELO DE ESTUDO

A informação da biologia reprodutiva do gato doméstico para espécies silvestres permite correlação e aplicação. Porém devemos considerar que, mesmo que o gato selvagem europeu (*Felis silvestris*), o gato-do-deserto (*Felis margarita*) e o gato-de-patas-negras (*Felis nigripes*, *black-footed cat*) sejam genética e morfologicamente classificados como parentes próximos do gato doméstico, os gêneros *Leopardus* e *Panthera* são considerados parentes mais distantes (COLLIER; O'BRIEN, 1985).

O gato doméstico é importante na pesquisa biomédica, servindo como animal modelo para anomalias e defeitos metabólicos homólogos às doenças humanas (WILDT, 1991).

Estudos em gatos domésticos teratospérmicos aumentaram o conhecimento sobre esta condição em felídeos selvagens (HOWARD, 1999).

O sucesso na criopreservação de espermatozóides do gato doméstico foi apresentado no início dos anos 70 com base em métodos descritos para sêmen canino. Envolvendo a utilização de um criodiluyente (contendo 20% de gema de ovo,

11% de lactose e 4% de glicerina) e gelo seco, seguido por imersão e armazenamento de pellets em nitrogênio líquido. A inseminação via vaginal de fêmeas com espermatozóides descongelados resultou em prenhez com sucesso de aproximadamente 10% (PLATZ et al., 1978). A inseminação intra-uterina laparoscópica melhorou esses resultados para aproximadamente 50% de prenhez. Até o momento, foram descritas gestações em leopardos, jaguatiricas e guepardos usando sêmen congelado (HOWARD, 1999). Contudo, os resultados inconsistentes da IA permanecem como desafio para a melhoria dos protocolos de criopreservação (PUKAZHENTHI et al., 2001).

Em muitas pesquisas com felídeos ameaçados de extinção, a produção *in vitro* de embriões com subsequente transferência tem complementado o uso da IA (FARSTAD, 2000).

Tanto a coleta de sêmen quanto a IA foram descritas em gatos pela primeira vez há 30 anos atrás. As técnicas mais avançadas tais como fertilização *in vitro*, Injeção Intracitoplasmática de Sêmen (ICSI) e clonagem têm sido efetuadas apenas experimentalmente e mesmo a IA ainda não está tão desenvolvida no gato como em outras espécies domésticas (AXNÉR; LINDE-FORSBERG, 2002).

2.3 FISIOLOGIA E MANEJO REPRODUTIVO

MOREIRA et al. (2001) relataram que a fisiologia reprodutiva da maioria dos pequenos felídeos neotropicais não havia sido estudada. Esta falta de informação básica dificulta o aperfeiçoamento das técnicas de reprodução assistida, tais como IA e transferência de embriões.

A puberdade nos machos é variavelmente descrita como o momento da primeira espermatogênese ou coincidente com a habilidade para ejacular. Evidências histológicas da espermatogênese nos gatos ocorrem aproximadamente com 20 semanas de idade e as células espermáticas estão presentes, quando os testículos excedem a 1 g em peso (JOHNSTON et al., apud LOPES, 2001).

As principais partes funcionais do aparelho genital masculino do gato são o pênis, escroto, testículos, ductos eferentes, epidídimos, ductos deferentes, ampola, glândulas acessórias incluindo a, próstata e glândulas bulbouretrais, não possuindo glândulas vesiculares (STABENFELDT; EDQVIST, 1996).

Espículas penianas são indicadores de maior concentração de testosterona nos gatos domésticos e seu desenvolvimento inicia-se com aproximadamente 12 semanas de idade (ARONSON; COOPER, 1967; apud LOPES, 2002).

Os espermatozóides começam a aparecer nos túbulos seminíferos do gato doméstico com 24 a 36 semanas de idade. O volume médio de uma ejaculação é de 0,05 ml (tendo uma variação de 0,03 até 0,3 ml) e contém de 60×10^6 a 15×10^8 espermatozóides/ml. O pH médio do sêmen é de 7,4. Numa ejaculação normal, a motilidade progressiva é de aproximadamente 80 a 90%. O sêmen do gato requer aproximadamente uma a duas horas para capacitação no trato reprodutor feminino (LEIN, 1989).

Em um trabalho publicado por MORAIS et al. (1996) observou-se que em gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*), a concentração de andrógenos fecais aumentou no inverno e na primavera ($p < 0,05$), acompanhada por aumentos nos testículos e nos volumes ejaculados e no número de espermatozóides móveis por ejaculação ($p < 0,05$). Para todas as espécies do gênero *Leopardus*, as concentrações dos metabólitos androgênicos foram positivamente correlacionadas com o volume ejaculado ($r = 0,38$; $p < 0,05$) e com o número total de espermatozóides por ejaculado ($r = 0,39$, $p < 0,05$).

Aumentos de produção espermática foram observados durante o verão para jaguatirica, gato-maracajá e gato-do-mato-pequeno. Resultados de avaliações reprodutivas indicaram que os machos destas espécies são capazes de reproduzir o ano todo (MORAIS et al., 2002)

Com relação às fêmeas de gato-do-mato-pequeno e jaguatirica, como a maioria dos felídeos, parecem ser primariamente ovuladoras induzidas, com a ovulação ocorrendo apenas após estímulo copulatório (MOREIRA, 2001).

O cio, na maioria dessas espécies, tem sido identificado como “silencioso”, ou as fêmeas mostram sinais sutis, difíceis para serem identificados na prática ou em procedimentos de rotina. O cio silencioso torna difícil a escolha do momento oportuno para introdução de pares cativos que, em casos de incompatibilidade comportamental, podem resultar em injúrias por luta ou mesmo morte. Considerando isso, as introduções iniciais com fins reprodutivos devem ser cuidadosamente monitoradas (MOREIRA, 2001).

2.4 COLHEITA DE SÊMEN

A colheita de sêmen em animais domésticos é geralmente feita com vagina artificial, eletroestimulação ou por manipulação digital. Uma vagina artificial pode ser usada para a colheita do sêmen também no gato doméstico, mas não é muito prática considerando o temperamento da espécie. A colheita através de manipulação digital não foi descrita no gato. O método mais comumente utilizado nos gatos é o da eletroejaculação (AXNÉR; LINDE-FORSBERG, 2002).

Os espermatozóides também podem ser obtidos dos epidídimos, depois da castração ou pós-morte. A região caudal do epidídimo é retirada e colocada em um compartimento apropriado (por exemplo, com meio Ham's F 10 ou PBS) a 37°C (AXNÉR, 1998).

A eletroejaculação é um método apropriado para espécies não-domésticas porque pode ser feita em animais anestesiados. Esta técnica envolve a estimulação dos nervos dos órgãos reprodutores por meio de uma corrente elétrica fraca. Um protocolo padronizado de eletroejaculação, no qual cada macho recebe o mesmo número de estímulos elétricos na mesma voltagem, é útil para comparar as características do ejaculado entre machos e resultados de diferentes locais (HOWARD, 1993).

Para a colheita do sêmen pela eletroejaculação, um estimulador elétrico e um transdutor retal são necessários e o gato deve estar anestesiado durante o procedimento. O eletroejaculador pode ser feito sob medida ou adquirido. O transdutor retal possui três eletrodos longitudinais. Ele é lubrificado e inserido de 7 a 9 centímetros no reto com os eletrodos dirigidos ventralmente (PLATZ et al., 1978).

Diferentes protocolos de estimulação foram descritos, mas muitos autores utilizam o descrito por HOWARD et al. (1986), que consiste em um total de 80 estímulos elétricos de 2 a 5 V aplicados em três séries (30, 30 e 20 estímulos). Cada estímulo é aplicado de forma a demorar aproximadamente 1 s para ir de 0 V à voltagem desejada, permanecendo por 2 a 3 s na voltagem desejada, seguido por um retorno abrupto a 0 V, onde permanece por 2 a 3 s. A primeira série consiste em 10 estímulos de 2 V, 10 de 3 V e, finalmente, 10 de 4 V. O gato então descansa por 2 a 3 min. A próxima série consiste de 10 estímulos a 3 V, 10 estímulos a 4 V e, finalmente, 10 a 5 V e o gato novamente descansa por 2 a 3 min. A última série

consiste de 10 estímulos de 4 V, seguidos por 10 de 5 V. Para cada estímulo, o gato responde com a extensão dos membros pélvicos. Para a colheita do sêmen, o pênis do gato é exposto pela aplicação de uma suave pressão em sua base, e o sêmen é colhido em um pequeno frasco pré-aquecido, colocado sobre o pênis (HOWARD et al., 1986).

Em avaliação reprodutiva realizada em jaguatirica, gato-maracajá e gato-do-mato-pequeno, o sêmen foi colhido usando um eletroejaculador de ondas alternadas de 60 Hz e transdutor retal contendo três eletrodos posicionados longitudinalmente. Uma seqüência regular de estímulos elétricos foram aplicados, em um modelo de três séries intercaladas (Séries 1 e 2 = 30 estímulos por série; Série 3 = 20 estímulos) em um intervalo de tempo aproximado de 10 min. Cada série consistiu de grupos repetidos de 10 estímulos aplicados em voltagens crescentes (de 2 a 6 V) (MORAIS et al., 2002).

Em gatos domésticos, ejaculados obtidos por eletroejaculação geralmente possuem maior volume, menor concentração, menor número de espermatozoides totais, quando em comparação com colheitas por vagina artificial. Isto se deve à estimulação elétrica das glândulas acessórias (AXNÉR; LINDE-FORSBERG, 2002).

A morfologia do sêmen colhido por uma vagina artificial não difere daquele colhido por eletroejaculação (PUKAZHENTHI et al., 2001).

Estimulação elétrica e anestésias repetidas não afetaram a capacidade de ejaculação do gato (PINEDA et al., 1984).

2.5 PROTOCOLOS ANESTÉSICOS

Para realizar a colheita por eletroejaculação, os animais são anestesiados e para isto são descritos vários protocolos. AXNÉR e LINDE-FORSBERG (2002) relataram para o gato doméstico o uso de medetomidina (Dormitor®, 80 µg/kg SC) associada ao cloridrato de cetamina (Ketalar®, 5 mg/kg IM). A anestesia obtida é suficiente para o processo de coleta e pode ser revertida com atipemazole.

Para coleta de sêmen em pequenos felídeos neotropicais MORAIS et al. (2002, p. 2029) relataram:

A anestesia foi induzida nos gatos-maracajás e gatos-do-mato-pequeno pelo uso de uma

combinação de cloridrato de cetamina 20 mg/kg, IM, (Ketaset, Fort Dodge Laboratories, Inc. Fort Dodge, LA 50501), associado com xilazina 1 mg/kg, IM (Rompun, Mobay Corp., Shawnee, KS 66205) e nas jaguatiricas foi utilizado a associação zolazepam/tiletamina 10 mg/kg, IM; (Telazol, Fort Dodge Laboratories, Inc, Fort Dodge, IA 50501) .

Certas anestésias relaxam a musculatura ao redor da bexiga, o que pode resultar em contaminação urinária do sêmen durante a coleta e uma rápida perda da motilidade. Esses fármacos compreendem o diazepam, derivados da fenotiazina tais como maleato de acepromazina, e anestésicos inalatórios, como o halotano e o isoflurano. A contaminação do sêmen obtido por eletroejaculação com urina é problemática em canídeos, ursídeos e felídeos (HOWARD, 1993).

SWANSON et al (2003) relataram a utilização, para eletroejaculação em felídeos neotropicais, da combinação de tiletamina-zolazepan (5 – 10 mg kg⁻¹; Telazol, Fort Dodge Laboratories Inc., Fort Dodge, IA) administrada por via intramuscular. Esta anestesia injetável produzia um plano anestésico adequado para eletroejaculação para todas as espécies com exceção do puma e do gato-mourisco.

TEBET (2004) descreveu a utilização de três protocolos para indução anestésica para colheita de sêmen por eletroejaculação: 1) cloridrato de cetamina (15 mg/kg; Vetaset, Fort Dodge) e midazolan (0,5 mg/kg; Dormire, Cristalia); 2) cloridrato de cetamina (15 mg/kg, Vetaset, Fort Dodge), midazolan (0,5 mg/kg, Dormire, Cristalia) e tartarato de butorfanol (0,2 mg/kg; Torbugesic 1%, Fort Dodge); 3) Cloridrato de tiletamina/zolazepan (10 mg/kg; Zoletil 50, Virbac), mantendo a anestesia com isoflurano inalatório, sendo que 53% dos ejaculados apresentaram contaminação por urina em pelo menos uma das séries. A autora observou ainda que animais em planos muito profundos ou superficiais e nos quais se utilizou tartarato de butorfanol, a incidência de contaminação por urina foi maior.

QUEIROZ (2003) realizou colheitas de sêmen em jaguatiricas por eletroejaculação com protocolo anestésico utilizando tiletamina/zolazepan (5 – 10 mg/kg; Zoletil 50, Virbac) e manutenção anestésica com isoflurano inalatório. Obteve dessa forma uma taxa de 75% de contaminação por urina em pelo menos uma fração do ejaculado e em 53% dos animais foi necessária suplementação anestésica a partir da dose inicial.

SILVA et al (2004, p. 161) citaram em trabalho de revisão sobre conservação de gametas em carnívoros:

Para a execução da eletroejaculação é utilizada anestesia com tiletamina/zolazepan ou cetamina associada à xilazina, em proporções que variam conforme a espécie. Entretanto algumas drogas interferem na qualidade espermática, como a acepromazina, com contaminação por urina (Morato e Barnabe, 1998). É importante também avaliar os riscos envolvidos no procedimento anestésico. De acordo com Osofsky et al. (1998) os fatores que devem ser considerados na seleção das drogas incluem eficiência, segurança, existência de um antagonista, disponibilidade e custo da droga.

Para as colheitas de sêmen deste experimento foi usado um protocolo anestésico baseado em trabalho publicado por PACHALY et al. (2002b) envolvendo um anestésico dissociativo (cloridrato de tiletamina) e um benzodiazepínico (zolazepan) associado a um α -2 agonista (cloridrato de xilazina). Esta associação anestésica não havia sido descrita para a finalidade de colheita de sêmen em felídeos.

O cloridrato de xilazina foi inicialmente sintetizado em 1962. Farmacologicamente, a xilazina é classificada como analgésico bem como sedativo e relaxante muscular esquelético. Não é um neuroléptico ou tranqüilizante, nem um agente anestésico. A xilazina é um potente agonista α 2-adrenérgico, ela age sobre o Sistema Nervoso Central (SNC) por ativação ou estímulo dos adrenocetores α , como os receptores α 2-adrenérgicos. Além da atividade α 2-adrenérgica, a xilazina possui efeitos α 1-adrenérgicos. Conseqüentemente, a xilazina desencadeia tanto ações periféricas como centrais sobre estes subtipos de receptores adrenérgicos (GROSS, 2003).

O cloridrato de tiletamina é um congênere da fenciclidina. A tiletamina em combinação com o zolazepan foi aprovada pelo FDA (*Food and Drugs Administration*) em 1982, para uso anestésico em cães e gatos. A tiletamina em grandes doses induz analgesia e anestesia geral em camundongos, ratos, gatos e macacos. Em gatos, doses de 6–13 mg/Kg de tiletamina e zolazepan forneceram anestesia satisfatória para intervenções cirúrgicas de 30 – 60 minutos (BRANSON, 2003).

2.6 ACONDICIONAMENTO E ANÁLISE DE SÊMEN DE FELÍDEOS

Estudos demonstraram o seguinte: 1) as características do sêmen e a

resposta para as várias técnicas de colheita do sêmen são espécie-específicas; 2) o sêmen do carnívoro é sensível à manipulação, e a manutenção da viabilidade do sêmen depende do método de processamento; 3) muitas espécies de felídeos produzem grandes proporções de espermatozóides de estrutura anormal, uma descoberta que parece estar relacionada com a perda da variabilidade genética. Embora consideradas importantes, estas características do sêmen não são uma medida direta de fertilidade do sêmen (HOWARD, 1993).

A manutenção da motilidade do sêmen *in vitro* é influenciada por inúmeros fatores, incluindo meio de cultura, pH e temperatura. Em muitas espécies, a viabilidade do sêmen é comprometida pelos componentes do plasma seminal. Não diluído, o sêmen puro geralmente mantém a motilidade *in vitro* por duas horas ou menos. A motilidade de espermatozóides ao natural pode ser melhorada com a diluição do sêmen com uma solução-padrão de cultivo de células, tais como o bicarbonato Krebs-Ringer (mKRB) modificado, Tyrode modificado ou Ham's F 10. Após uma centrifugação de baixa velocidade (ex. 300 G), a remoção do plasma seminal prolonga significativamente a duração da motilidade do sêmen. A maioria das ejaculações dos felídeos contém inúmeros tipos de bactérias, por isso, são primordiais a lavagem do sêmen e a remoção do plasma seminal para eliminar estes microorganismos (HOWARD, 1993).

O meio de cultivo Ham's F 10 é geralmente usado no processamento de espermatozóides de felídeos para inseminação artificial ou fertilização *in vitro*. Foram descobertas muitas diferenças espécie-específicas na motilidade do sêmen, sensibilidade de capacitação e fertilização para este meio. O sustento da motilidade dos espermatozóides é aperfeiçoado pela adição de uma fonte de proteína para o meio de cultivo. A função dos espermatozóides de certas espécies normospérmicas, incluindo gato doméstico, tigre e leopardo, é mantida no soro fetal bovino (PUKAZHENTHI et al., 2001).

Para avaliação do sêmen de felídeos silvestres, SWANSON et al. (1996b, p88) descreveram o seguinte procedimento:

Os espermatozóides recolhidos foram avaliados imediatamente pela percentagem de motilidade e pelo grau de movimento progressivo (escala de 0 a 5, com 0 = imóvel e 5 = rápido e progressivo) (Wildt et al., 1983; Howard et al., 1986). Uma amostra (5 a 10 µl) foi fixada em 3% (V/V) de glutaraldeído e depois avaliada para obter-se a morfologia do sêmen (200 espermatozóides por ejaculação) usando-se um microscópio de contraste de fase (X

1000) para identificar malformações específicas (Howard et al, 1986). A concentração de sêmen ($\times 10^6 \text{ ml}^{-1}$) foi determinada com 5 μl de sêmen natural (sem congelar), utilizando-se uma câmara de hematologia (Howard et al., 1986) e o pH do sêmen foi aferido usando-se uma fita (EM Science Gilbstown, MS).

Uma análise descritiva do sêmen determina o volume do ejaculado, pH, porcentagem de motilidade espermática, motilidade progressiva, concentração, morfologia e integridade acrossomal. Para determinar um índice de motilidade espermática com ênfase na porcentagem de motilidade e movimento progressivo foi criado o Índice de Motilidade Espermática (IME), que é calculado por:

$$\text{IME} = \frac{\text{Motilidade espermática (\%)} + (\text{movimento progressivo} \times 20)}{2}$$

A morfologia espermática é avaliada fixando-se uma alíquota de sêmen com glutaraldeído a 1%, posteriormente analisada em microscópio de contraste de fase com aumento de 1000 x (HOWARD, 1993).

A avaliação da integridade acrossômica é necessária para a avaliação do sêmen, pois o acrossoma é essencial para o processo de fertilização. A morfologia acrossômica é avaliada usando um microscópio de contraste de fase (1000 x) e é dividida em quatro categorias: 1) ápice normal, crescente e sem saliência no acrossoma; 2) ápice defeituoso, com forma irregular no ápice do acrossoma; 3) falta do ápice, com ápice inexistente, mas com uma capa acrossômica firmemente aderida ao núcleo; 4) capa acrossômica solta, com a capa acrossômica desprendida e vesiculada (HOWARD, 1993).

Caracteriza-se teratospermia como sendo uma porcentagem menor que 40% de espermatozóides normais presentes no ejaculado e normospermia como uma porcentagem maior que 60% de espermatozóides normais presentes no ejaculado (NEUBAUER et al., 2004 ; PUKAZHENTHI et al., 2001).

A teratospermia freqüentemente está presente em felídeos, incluindo certos gatos domésticos, mas os mecanismos celulares e moleculares que provocam este fenômeno são desconhecidos (NEUBAUER et al., 2004).

Os parâmetros de sêmen encontrados em gatos domésticos são apresentados na Tabela 1 (AXNÉR; LINDE-FORSBERG, 2002).

TABELA 1 - PARÂMETROS SEMINAIS EM GATO DOMÉSTICO

Parâmetro	Valor
Volume do ejaculado	Por vagina artificial – Média 0,034 a 0,04 ml (variação 0,01-0,12 ml) Por eletroejaculação – Média 0,076 a 0,22 ml (variação 0,019-0,74 ml)
Concentração (espermatozóides/ml)	Por vagina artificial – Média 1730×10^6 espermatozóides/ml (variação $96-5101 \times 10^6$ /ml) Por eletroejaculação – Média $168-136 \times 10^6$ /ml
Número total de espermatozóides por ejaculado	Por vagina artificial – Média $57 - 61 \times 10^6$ (variação $3-117 \times 10^6$) Por eletroejaculação – Média $12 - 30 \times 10^6$ ($9 - 153 \times 10^6$)
Morfologia do esperma	Grande variação individual. Média 38,2% para mais de 90% de espermatozóides normais. Esta média difere entre estudos devido a diferentes métodos de fixação e classificação.
Motilidade	Altamente variável, de 56% a 84%
pH	6,6 - 8,8
Osmolalidade	320-330 mOsm/Kg (variação 274-390 mOsm/Kg)
ALP	Em todo sêmen 160 a 355 UI Em fluido prostático e secreções da glândula bubouretral 228 a 445 UI Em fluido prostático – 281 UI

FONTE: AXNÉR e LINDE-FORSBERG (2002)

Para jaguatirica (*Leopardus pardalis*), gato-maracajá (*Leopardus wiedii*) e gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*), MORAIS et al. (2002) relataram os parâmetros apresentados na Tabela 2.

Pouco se sabe sobre a correlação entre diferentes parâmetros do sêmen e fertilidade sob condições naturais no gato. O que tem sido mostrado é que sêmen de gato com grandes proporções de anomalias têm menor habilidade de penetrar o oócito *in vitro* comparado com espermatozóides com baixa proporção de anomalias. Por outro lado, ejaculados de machos com alta proporção de espermatozóides anormais têm apresentado boa fertilidade (AXNÉR e LINDE-FORSBERG, 2002).

TEBET (2004) encontrou uma média de 70% de espermatozóides morfolologicamente normais em sêmen *in natura* de gato-do-mato-pequeno, sendo 13,2% de defeitos maiores e 16,35% de defeitos menores, prevalecendo os defeitos de cauda enrolada e cauda dobrada. Já MORAIS et al. (2002) relataram uma incidência média de 59,2% de células espermáticas com morfologia anormal em sêmen de gato-do-mato-pequeno e SWANSON et al. (2003) descreveram uma

média de 64,4% de espermatozóides pleomórficos em colheitas de sêmen de gato-do-mato-pequeno em zoológicos da América Latina.

TABELA 2 - VALORES DE PESO, VOLUME TESTICULAR E CARACTERÍSTICAS DE SÊMEN EM MACHOS DE JAGUATIRICA (*Leopardus pardalis*) (n=3), GATO-MARACAJÁ (*Leopardus wiedii*) (n=3) E GATO-DO-MATO-PEQUENO (*leopardus tigrinus*) (n=4)

	Jaguaririca (n = 42) ¹	Gato-maracajá (n = 41) ¹	Gato-do-mato- pequeno (n = 52) ¹
Peso (kg)	14,3 ± 0,4 ^a	3,4 ± 0,1 ^b	3,0 ± 0,1 ^b
Volume testicular (cm ³)	32,0 ± 1,3 ^a	6,2 ± 0,2 ^b	4,2 ± 1,2 ^c
Volume testicular/kg (cm ³ /kg)	2,3 ± 0,1 ^a	1,8 ± 0,1 ^b	1,4 ± 0,1 ^c
Volume sêmen (ml)	1,4 ± 0,1 ^a	0,5 ± 0,01 ^b	0,3 ± 0,1 ^c
pH	7,5 ± 0,1 ^b	8,3 ± 0,1 ^a	7,6 ± 0,1 ^b
Concentração espermática (x10 ⁶ /ml)	101,2 ± 10,6 ^b	75,6 ± 11,0 ^b	411,9 ± 46,3 ^a
Número de espermatozóides/ejaculado (x10 ⁶)	137,9 ± 18,7 ^a	32,0 ± 3,9 ^b	103,7 ± 12,6 ^a
Motilidade espermática (%)	81,4 ± 1,2 ^a	73,5 ± 1,3 ^b	71,4 ± 2,3 ^b
Movimento progressivo espermático (0-5)	3,7 ± 0,1 ^a	3,4 ± 0,1 ^b	3,8 ± 0,1 ^a
Motilidade espermática fórmula ²	77,5 ± 1,3 ^a	70,5 ± 1,3 ^b	74,1 ± 1,8 ^{a,b}
Células móveis/ejaculado (x10 ⁶) ³	114,7 ± 15,8 ^a	23,4 ± 2,8 ^c	74,2 ± 8,9 ^b
Número de espermatozoides/volume testicular (x10 ⁶ /cm ³) ⁴	4,0 ± 0,5 ^a	5,0 ± 0,6 ^a	23,3 ± 2,8 ^b

FONTE: MORAIS et al. 2002.

NOTA: Valores com diferenças significativas (p<0,05)

¹Valor por ejaculação

²Motilidade espermática fórmula = [porcentagem de motilidade + (20x motilidade progressiva espermática)]/2

³Motilidade espermática = Número de espermatozóide x motilidade de espermatozóide (%)

⁴Número de espermatozóide por ejaculação/volume testicular

2.7 CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE FELÍDEOS

Atualmente existem várias descrições de protocolos de congelamento de sêmen em gato doméstico (AXNÉR; LINDE-FORSBERG, 2002; LENGWINAT; BLOTTNER, 1994; LUVONI et al., 2003; ZAMBELLI et al., 2002) e em felídeos selvagens (PUKAZHENTHI et. al., 2001; HOWARD, 1993; SWANSON et al, 1996b). Entretanto, em gato-do-mato-pequeno somente foi relatado congelamento de sêmen por MORAIS (2001); SWANSON et al. (2003) e TEBET (2004), ainda assim em um pequeno número de indivíduos.

Protocolos de criopreservação expõem as células espermáticas a inúmeras

situações de estresse como as variações de temperatura e exposição a temperaturas não fisiológicas, estresse osmótico pelos elevados gradientes de concentração de solutos do meio diluidor de congelação e pela formação e dissolução de cristais de gelo no meio extracelular, os quais comprometem sua viabilidade (WATSON; MARTIN, 2000).

Para minimizar os efeitos estressantes da congelação, algumas substâncias crioprotetoras são adicionadas ao sêmen, promovendo alterações das propriedades físicas da solução. Estes agentes crioprotetores podem penetrar ou não a membrana plasmática, dependendo do seu peso molecular (AMANN; PICKETT, 1987).

O crioprotetor de escolha para espermatozóides é o glicerol (WATSON, 1990). Em felídeos foram utilizados dois crioprotetores permeáveis em processos de congelamento de sêmen, o glicerol e o dimetil-sulfóxido (DMSO) (PUKAZHENTHI et al., 2002).

O sucesso na criopreservação de espermatozóides do gato doméstico foi apresentado no início dos anos 70, usando métodos descritos para trabalho com espermatozóides de cão, isto envolveu o sêmen adicionado a um criodiluyente (20% gema de ovo, 11% lactose e 4% glicerol) em gelo seco, seguido por imersão e armazenamento de *pellets* no nitrogênio líquido. (PLATZ et al., 1978).

PLATZ et al. (1978) também relataram a prenhez em 6 de 56 fêmeas inseminadas, no fundo da vagina, com 50 a 100×10^6 espermatozóides móveis, previamente congelados em forma de *pellets*, com o meio diluidor descrito. Quatro das seis fêmeas foram inseminadas durante o estro natural e duas em estro induzido.

AXNÉR e LINDE-FORSBERG (2002, p. 1) descreveram o seguinte protocolo para criopreservação de sêmen em felinos domésticos, utilizando palhetas para envase:

A amostra do sêmen é centrifugada a 700 G por 6 min e o sêmen é ressuspenso em Uppsala Equex Extender 1 para dobrar a concentração final desejada do sêmen. A melhor concentração para criopreservação de espermatozóides de gatos ainda não foi determinada. Depois de uma hora de resfriamento da temperatura ambiente para 4°C em um volume igual de Uppsala Equex Extender 2. O sêmen do gato é então colocado em palhetas de 0,25 ml e congelado, com os tubos sendo colocados em suportes, que são presos em uma grade, que é abaixada em três etapas para dentro de um botijão (Apolo SX-18 LN, MVE Cryogenetics, Nova Praga, Minnessota, EUA). O botijão deve conter 16 a 18 cm de nitrogênio líquido, e a grade é mantida por 2, 2 e 1 minuto a 7, 13 e 20 cm abaixo da abertura do botijão.

As palhetas são descongelados em água, a 37°C, por 15 s e esvaziadas em um tubo com o mesmo volume de um meio de descongelamento Uppsala Equex Thaw a 37°C para permitir o reequilíbrio a essa temperatura com ausência de luz, por 5 min antes do exame e de proceder a IA.

TABELA 3 - COMPOSIÇÃO DOS MEIOS “UPPSALA EQUEx”

	<i>Uppsala Equex Extender 1</i>	<i>Uppsala Equex Extender 2</i>	<i>Uppsala Equex Thaw médium</i>
Tris	2,4 g	2,4 g	2,4 g
Ácido cítrico	1,4 g	1,4 g	1,4 g
Glicose	0,8 g	0,8 g	0,8 g
Na-Benzylpenicilina	0,06 g	0,06 g	0,06 g
Estreptomicina	0,1 g	0,1 g	0,1 g
Gema de ovo	20 ml	20 ml	20 ml
Glicerol	3 ml	7 ml	-
Equex STM Paste®	-	1 ml	-
Água destilada	Para 100 ml	Para 100 ml	Para 100 ml

FONTE: AXNÉR e LINDE-FORSBERG (2002)

Outro exemplo de extensor que foi usado para o armazenamento de sêmen resfriado de gato e para a criopreservação é o meio de preservação com TesT-gema de ovo com composição a base de ácido N-Trishidroximetil-metil2-aminometano-sulfônico (Tes) 11,2 g em 150 ml de água destilada, Trishidroximetil-aminometano (Tris) 2,9 g em 75 ml de água destilada, gema de ovo 15 – 20%, glicerol (pode ser omitido para resfriamento) 7 – 7,5 %, penicilina G 1000 UI/ml, estreptomicina 1 mg/ml, sendo titulado para pH 7,4 (LENGWINAT; BLOTTNER, 1994).

Maria Denise LOPES, em palestra proferida em 6 de Junho de 2002, por ocasião do II Sipara (Simpósio Paranaense de Reprodução Animal), realizado na cidade de Londrina - PR, relatou que no Brasil tem sido utilizado em gato doméstico um protocolo de congelamento de sêmen a base de: Trishidroximetil-aminometano (Tris) 2,9 g em 100 ml de água destilada, gema de ovo 20%, glicerol 6 %, penicilina 1000 UI/ml. Após adição do sêmen na diluição adequada, o mesmo foi envasado com seringas e agulhas hipodérmicas em palhetas de 0,25 ml devidamente identificadas. As palhetas foram lacradas e acondicionadas em câmara fria a 4°C por 30 a 60 min para resfriamento. Na seqüência foram colocadas em vapor de nitrogênio a uma distância de 4 cm do nível do nitrogênio líquido durante 7 min e por

fim mergulhadas em nitrogênio líquido, completando o processo de congelamento.

TEBET (2004) testou dois protocolos de criopreservação de sêmen em *Leopardus tigrinus* e *Leopardus pardalis*, um a base de Tris, Equex, glicose, gema de ovo, sulfato de amicacina, glicerol 7% e outro denominado MP-50 com açúcares, citrato de sódio, citrato de potássio, EDTA, gema de ovo, leite em pó desnatado, Hepes, Dubelcco's Modifield Eagle's, sulfato de amicacina, glicerol 3% e dimetil formamida 2%, encontrando resultados similares entre os dois criodiluentes, sendo que o *Leopardus tigrinus* apresentou decréscimo marcante no índice de motilidade progressiva (média de 36,3 pontos).

TSUTSUI et al. (2000) congelaram sêmen de gato doméstico em um diluente a base de gema de ovo, tris-frutose, ácido cítrico em uma solução de citrato de sódio e gema de ovo e relataram taxa de prenhez de 57% (8/14), quando utilizaram 50×10^6 espermatozóides para inseminação intra-uterina em fêmeas com cio natural.

PUKAZHENTHI et al. (2004) relataram resultados positivos de criopreservação de sêmen em leopardo-nebuloso (*Neofelis nebulosa*) usando o *TEST Yolk bufer (TYB)* contendo 4% de glicerol (Irvine Scientific, CA), que é um criopreservante desenvolvido para resfriamento e congelamento de sêmen humano.

O uso de ingredientes de origem animal, como gema de ovo, em diluentes de sêmen representa um risco de contaminação microbiana. Busca-se portanto alternativas, como um diluente comercialmente disponível para bovinos (Bioxcell, IMV, L'Aigle, França), que não contém ingredientes de origem animal e já foi testado em criopreservação de sêmen de carneiros (GIL et al., 2003) e alpacas (*Lama pacos*) (VAUGHAN et al., 2003).

Um diluente ideal para congelamento de sêmen felino ainda não foi definido, visto que o movimento progressivo e a morfologia acrossomal são altamente afetados nos procedimentos de criopreservação com os diluentes conhecidos (LUVONI et al., 2003).

LUVONI et al. (2003) relataram que o uso de taurina a 25 mM na composição dos meios de criopreservação de sêmen felino produz um efeito benéfico na motilidade espermática pós descongelamento.

ZAMBELLI et al. (2002) testaram cinco curvas de resfriamento e congelamento para sêmen felino, utilizando um diluente a base de Tris, gema de ovo e glicerol. Após o processo de diluição, resfriaram as doses a uma taxa de 0,2 °C/s,

deixando em equilíbrio mais 25 min. a 5°C, para então submeter ao processo de congelamento com auxílio de vapor de nitrogênio em um container. As amostras foram congeladas com taxas de queda de temperatura de 3,85; 9,00; 22,8; 36,00 e 43,00 °C/min, sendo observados melhores resultados para motilidade espermática e menores danos acrossomais com as taxas de congelamento mais lentas a 3,85 °C/min.

Utilizando uma máquina de congelação (*Cell Freezer R204*), TSUTSUI et al. (2000) descreveram o seguinte protocolo para resfriamento e congelamento de sêmen felino: inicialmente o sêmen era resfriado até 4 °C, quando eram completadas as etapas de diluição e as amostras permaneciam em equilíbrio por uma hora. As condições de temperatura do *freezer* eram – 1 °C/min de 4°C até – 1,0 °C; – 33,0 °C/min. de – 1,0 até – 50° C e – 58,4 °C/min de – 50 °C até – 196 °C, quando o sêmen era transferido para um container com nitrogênio líquido .

Outro protocolo de criopreservação está sendo testado com resultados promissores: a porcentagem de acrossoma intacto foi cerca de 20% maior em animais normospermicos, quando se utilizou taxa de refrigeração de 0,5°C/min (GOODROWE et al., 2000).

As membranas acrossômicas são facilmente prejudicadas durante o congelamento e descongelamento. Portanto, a avaliação do estado acrossômico é um importante critério para a determinação das habilidades crioprotetoras dos vários diluentes e métodos de congelamento (HOWARD, 1993).

POPE et al. (1991) descreveu uma técnica para avaliação da integridade acrossomal em sêmen felino, utilizando um corante a base de rosa bengala 1%, *fast green* 1% e álcool etílico 40% em 0,1 M de ácido cítrico e 0,2 M de fosfato de sódio.

SOJKA et al. (1970) relataram que pelo menos 5 - 50 x 10⁶ espermatozóides são necessários para resultados de prenhez entre 40 e 67%, após inseminação vaginal com sêmen fresco em gato doméstico. Quando as fêmeas foram inseminadas duas vezes em dois dias consecutivos, com 5x10⁶ espermatozóides, o nível de concepção foi de 75% (6/8 fêmeas).

Gatas têm parido após IA, utilizando-se sêmen fresco ou congelado, depositado no fundo vaginal ou nos cornos uterinos, via laparoscopia. Nesta situação, as ovulações podem ser induzidas com 50 ou 250 UI de hCG (gonadotropina coriônica humana), intra-muscular, administrada no dia que antecede

ou no dia da inseminação (PLATZ et al., 1978).

A inseminação laparoscópica também é usada nos gatos (DONOGHUE et al., 1996) e as taxas de prenhez são mais altas quando comparamos com a IA via vaginal. O momento da IA em relação à estimulação gonadotrópica e o protocolo anestésico influenciam as taxas de gestação, sendo que o melhor momento para a IA é após a ocorrência das ovulações (HOWARD, 1999).

Os maiores índices de prenhez ocorrem, tanto na cadela quanto na gata, quando o sêmen é depositado no útero, quando comparados com os obtidos com sêmen colocado na vagina, além de um menor número de espermatozóides ser necessário para a inseminação intra-uterina (AXNÉR; LINDE-FORSBERG, 2002).

Para melhorar a taxa de concepção, é importante aumentar o número de espermatozóides para a inseminação e inseminar ambos os cornos uterinos (TSUTSUI et al., 2000).

Uma estratégia de análise de diversas características fornece um índice mais exato do real desempenho reprodutivo. Este caminho permite a avaliação dos parâmetros do sêmen (motilidade do sêmen, motilidade progressiva, concentração e morfologia), a longevidade da viabilidade do sêmen, integridade acrossômica e a habilidade de fertilização do espermatozóide. A penetração de oócito homólogo e heterólogo pode ser usada para avaliar a função do sêmen, a capacitação, reação acrossômica, interação oócito-espermatozóide, e fatores que influenciam a fertilização (HOWARD, 1993).

2.8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Mesmo que a pesquisa básica no gato doméstico tenha sido valiosa para o desenvolvimento de técnicas de reprodução assistida, as características específicas das espécies induzem a necessidade de um certo nível de pesquisa fundamental como pré-requisito para cada espécie ainda não estudada de felídeo selvagem.

Enquanto esses resultados lançaram um fundamento de conhecimento básico, mais pesquisas são necessárias para a maior aplicabilidade da IA (WILDT; ROTH, 1997).

A reprodução assistida, se usada apropriadamente, incluindo IA, fertilização *in vitro* (IVF), transferência de embriões e a formação de bancos de reserva

genômica, têm aplicação para o manejo e conservação de pequenos felídeos. É possível que no futuro a reprodução assistida possibilite o movimento de material genético, ao invés de animais vivos. Essas técnicas também podem ser usadas para reproduzir indivíduos incompatíveis e para infundir novo material genético em populações cativas (MOREIRA, 2001).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Efetuar pesquisa aplicada, destinada a ampliar conhecimentos e contribuir para a conservação desta espécie ameaçada de felídeo neotropical.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Testar protocolos anestésicos para colheita de sêmen na espécie, melhorando a eficácia e mantendo a segurança;

Descrever resultados de exames andrológicos para a espécie *Leopardus tigrinus*, contribuindo para o conhecimento de sua fisiologia reprodutiva;

Experimentar protocolos diferenciados para a criopreservação desse sêmen.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Neste trabalho foram realizados três experimentos que, embora utilizando os mesmos animais, apresentaram objetivos distintos.

No primeiro experimento foi utilizada uma associação farmacológica na contenção e anestesia dos animais, para a colheita de sêmen, com três doses distintas. Foram testadas a eficácia e a segurança das doses anestésicas para o procedimento proposto.

O segundo experimento realizado corresponde a uma pesquisa descritiva exploratória, na qual foram descritos os parâmetros andrológicos para a espécie gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*), com machos mantidos em cativeiro e com dieta balanceada.

Por fim, no terceiro experimento foram testados protocolos de criopreservação de sêmen com dois diluentes diferentes: o Bioxcell® (IMV Technologies, L'Aigle, França) - (BIOX) e o *Refrigeration Médium* – Test Yolk Buffer® (Irvine Scientific, Santa Ana, CA, EUA) – (TYB-r) associado ao *Freezing Médium* Test Yolk Buffer® (Irvine Scientific, Santa Ana, CA, EUA) – (TYB-f); todos de linha comercial, utilizados rotineiramente em bovinos e humanos, respectivamente. Também foram testadas três curvas de resfriamento-congelamento distintas, sendo duas curvas com auxílio de refrigerador comum e caixa térmica com nitrogênio e uma curva com auxílio do equipamento TK-3000®, próprio para resfriamento e congelamento de sêmen. A metodologia dos três experimentos está descrita a seguir.

4.1 LOCAL E PERÍODO

A parte experimental deste trabalho foi realizada de setembro de 2004 a janeiro de 2005.

A manutenção dos animais em cativeiro, a contenção física e farmacológica, a colheita de sangue, a colheita e análise imediata do sêmen, foram realizadas no Criadouro de Animais Silvestres da Itaipu Binacional (CASIB), utilizando as dependências do Hospital Veterinário da instituição, no município de Foz do Iguaçu -

PR, Brasil, com a seguinte localização geográfica: latitude: 25°32' sul, longitude: 54° 53' oeste.

Os hemogramas foram realizados no Laboratório Ambiental da Itaipu Binacional, em Foz do Iguaçu - PR.

A análise do sêmen pós-descongelamento foi realizada no Laboratório de Reprodução Animal do Campus Palotina da UFPR, em Palotina - PR.

4.2 ANIMAIS E RECINTOS

Foram utilizados 12 machos de gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*), adultos, mantidos em cativeiro, alguns com origem da natureza e outros nascidos em cativeiro (Quadro 1). Os animais identificados com *microchip* foram numerados de 1 a 12 para a descrição neste trabalho. Os machos de número 1 a 10 foram submetidos à colheita de sêmen em três ocasiões, com intervalo mínimo de 30 dias. O animal 12 foi submetido à colheita em duas ocasiões e o animal 11 nenhuma, totalizando 32 colheitas no experimento.

Os animais foram disponibilizados pela equipe veterinária do CASIB, conforme estado clínico epidemiológico, constatado na ocasião da coleta.

Três animais estavam alojados com fêmeas (Quadro 1) e as condições de cativeiro apresentavam pequenas diferenças de ambientação com área cercada por tela e alvenaria, piso de terra e areia, parte do abrigo com cimento, vegetação, troncos e caixa de abrigo e dimensões variando de 10 à 32 m², com exceção do animal GMP12, que estava no setor de internação especial, sem solário, com tronco, caixa abrigo e sem vegetação em área de 8 m².

A dieta destes animais era constituída de carne bovina (4 X/semana), pescoço de frango (3 X/semana). Estes alimentos eram fornecidos em dias alternados. Todos os animais receberam suplementação vitamínica, mineral e aminoácidos (Aminomix, Vetnil, Luoveiro-SP, Brasil), diariamente.

QUADRO 1 - IDENTIFICAÇÃO DOS ANIMAIS, PESO MÉDIO E PRESENÇA DE FÊMEA NO RECINTO

Gato-do-mato-pequeno (GMP)	Microchip	Peso médio (kg)	Presença de fêmea no recinto
GMP 1	0125535A	3,370	Não
GMP 2	01C6C1B8	3,600	Sim
GMP 3	01BEB568	2,800	Não
GMP 4	01BDFFO	2,100	Não
GMP 5	01E09672	2,300	Sim
GMP 6	01C58C09	2,655	Sim
GMP 7	01E64FBD	2,650	Não
GMP 8	01267BC1	2,235	Não
GMP 9	01C5CB9B	2,560	Não
GMP 10	01BDB553	3,100	Não
GMP 11	012689DF	3,650	Não
GMP 12	01255ECA	3,350	Não

4.3 CONTENÇÃO FÍSICA

A contenção física foi realizada com puçá, seguida da utilização de caixa de contenção, para transporte, pesagem e sedação. A partir da segunda colheita, a pesagem foi realizada após sedação, para minimizar os efeitos do estresse.

4.4 CONTENÇÃO FARMACOLÓGICA

Os animais submetidos à contenção farmacológica permaneceram em jejum alimentar de pelo menos 12 horas, prévio ao procedimento.

Os protocolos anestésicos utilizados constam da associação de cloridrato de xilazina (Virbaxil[®], Virbac, Cedex, França) e cloridrato de tiletamina /zolazepan – (Zoetil[®], Virbac, Cedex, França), em três doses diferentes, descritas a seguir:

- a) primeira etapa – 10 anestésias com 0,67 mg/kg de cloridrato de xilazina e 6,7 mg/kg de cloridrato de tiletamina/zolazepan;
- b) segunda etapa – 12 anestésias com 0,9 mg/kg de cloridrato de xilazina e

6,7 mg/kg de cloridrato de tiletamina/zolazepan;

- c) terceira etapa – 11 anestésias com 1,3 mg/kg de cloridrato de xilazina e 6,7 mg/kg de cloridrato de tiletamina/zolazepan.

Em algumas ocasiões, quando a contenção farmacológica inicial não propiciava segurança para a manipulação do animal, foi necessária a aplicação complementar de anestésicos, sendo então administrado $1/2$ da dose inicial.

Os animais foram monitorizados por médico veterinário da equipe do CASIB, sendo aferidos a cada 10 minutos os valores de frequência cardíaca, frequência respiratória, pulso, avaliação algimétrica por compressão de periósteo em falanges de membros pélvicos e torácicos (padronizados como A – ausência dolorosa, B – leve sensibilidade dolorosa e C – grande sensibilidade dolorosa), grau de relaxamento muscular (mensurados como A – excelente, B – bom e C – ruim) conforme descrito por PACHALY (1998), reflexos córneo-palpebrais e nível de consciência, até que os animais obtivessem o retorno do nível de consciência, quando então eram devolvidos ao recinto original. A eficácia da colheita de sêmen também foi considerada para fins de avaliação dos protocolos anestésicos.

4.5 EXAME CLÍNICO E LABORATORIAL

Após a anestesia e perda da consciência e de reações a estímulos externos, todos os animais eram submetidos à criteriosa avaliação clínica, como estado nutricional, pesquisa de dermatopatias, aferição de parâmetros fisiológicos, palpação abdominal e músculo-esquelética, radiografias torácicas, exame da cavidade oral, exame oftalmológico direto e eletrocardiografia.

Em todos os animais submetidos à anestesia foram colhidas alíquotas de sangue por punção jugular, para exames hematológicos e arquivo de banco sorológico.

O hemograma foi realizado subsequente aos procedimentos, pela equipe do Laboratório Ambiental da Itaipu Binacional.

4.6 EXAME ANDROLÓGICO

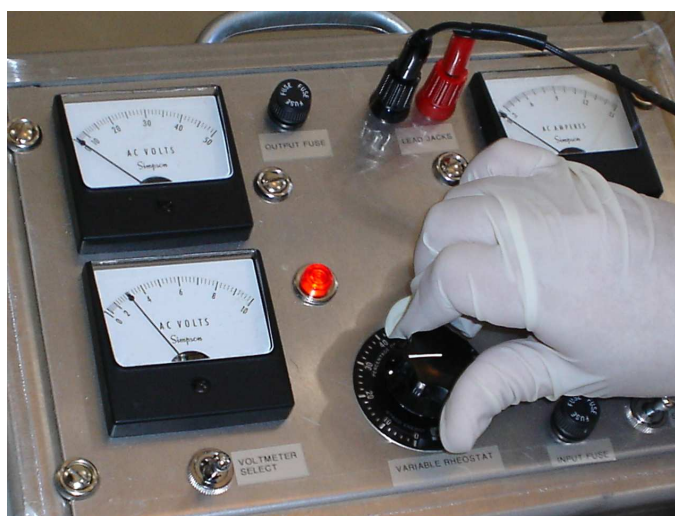
4.6.1 Avaliação da Genitália Externa

Os testículos foram palpados para definição de consistência, sendo classificados como duro, normal ou flácido. Foram mensurados o comprimento e a largura com auxílio de um paquímetro. Para o volume total foi utilizada a fórmula $V = C \times L^2 \times 0,524$; onde V = volume testicular, C = comprimento testicular, L = largura testicular (WILDT, 1993). O pênis e o prepúcio foram examinados quanto à morfologia, presença de secreção e de espículas na glândula.

4.6.2 Colheita de Sêmen

O sêmen foi obtido pelo método da eletroejaculação, utilizando um equipamento para uso em animais selvagens (PT Electronics®, modelo 303, EUA). O transdutor usado para o gato-do-mato-pequeno é o mesmo usado para gato doméstico, com comprimento de 12,6 cm e diâmetro de 1,0 cm; comprimento dos eletrodos de 2,1 cm e distância entre os eletrodos de 0,7 cm.

FIGURA 2 - EQUIPAMENTO DE ELETROEJACULAÇÃO (PT ELECTRONICS, MODELO 303, EUA)



Esse equipamento utilizado para geração dos estímulos consiste em um

aplicador de corrente alternada com voltagens controladas de 0 a 12 V, com um transdutor acoplado (*probe*), que é inserido no reto do animal. O protocolo de eletroejaculação utilizado foi o proposto por HOWARD (1993); e consistiu em um total de 80 estímulos elétricos de 2 a 5 V aplicados em três séries (30, 30 e 20 estímulos). Cada estimulação foi aplicada de forma a aumentar a intensidade lentamente para ir de 0 V ao estágio de voltagem desejado, quando então permanecia por 2 a 3 s na voltagem desejada, seguida por um retorno abrupto a 0 V, onde permanecia por 2 a 3 s. A primeira série consistiu em 10 estímulos de 2 V, 10 de 3 V e, finalmente, 10 de 4 V. O animal então descansava por aproximadamente 10 min. A próxima série consistia de 10 estímulos a 3 V, 10 estímulos a 4 V e, finalmente, 10 a 5 V e o animal novamente descansava por 10 min. A última série consistia de 10 estímulos de 4 V, seguidos por 10 de 5 V. Para cada estímulo, o animal respondia com a extensão dos membros pélvicos. Para coletar o sêmen, o pênis do animal era exposto pela aplicação de uma suave pressão em sua base com um pequeno frasco plástico transparente (*Eppendorf*[®], Hamburgo, Alemanha) de 1,5 ml pré-aquecido, que era colocado sobre o pênis.

A cada conjunto de 10 estímulos, caso o sêmen tivesse sido obtido, o frasco de coleta era trocado, visando preservar a alíquota de sêmen de possível contaminação por urina. Em caso de visualizar a presença de urina pela coloração amarelada ou volume excessivo, o frasco também era trocado.

Os frascos coletados permaneciam em plataformas suporte de isopor em temperatura ambiente controlada de 20° C, até a avaliação e processamento.

FIGURA 3 - COLHEITA DE SÊMEN EM GATO-DO-MATO-PEQUENO (*Leopardus tigrinus*)



4.6.3 Avaliação do Sêmen

Após o término de cada série, era realizada a avaliação parcial do sêmen quanto a aspecto, motilidade, vigor, e volume.

Ao final da coleta, as alíquotas obtidas com presença de espermatozóides móveis eram combinadas e analisadas para aspecto, volume final, concentração, pH, motilidade, vigor e morfologia espermática.

Descrição das técnicas empregadas:

- a) aspecto: descrição visual do ejaculado, quanto à cor e viscosidade;
- b) volume: mensurado em μL com auxílio de uma micro-pipeta de volume variável de 0 – 100 μL (Eppendorf[®], Hamburgo, Alemanha);
- c) pH: foram utilizadas fitas reagentes graduadas (Merck[®], Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, NJ, EUA.) para mensuração;
- d) motilidade e vigor espermático: uma alíquota de 5 μL era depositada em uma lâmina pré-aquecida, recoberta com lamínula, também pré-aquecida (36 °C) e avaliada em microscópio óptico (Olympus[®]), contendo placa aquecedora (36 °C) em um aumento de 100 X, classificando de acordo

com critérios definidos por HOWARD (1993). A avaliação da motilidade foi subjetiva e classificada em escala de 0% a 100%, conforme o número de espermatozóides encontrados vivos e o vigor, também de avaliação subjetiva, foi classificado de 0 a 5, sendo: 0 – sem motilidade; 1 – movimentos laterais leves sem progressão; 2 – movimentos laterais moderados com progressão ocasional; 3 – movimento progressivo, porém lento; 4 – movimento progressivo constante com velocidade moderada; 5 – movimento progressivo constante com velocidade rápida;

- e) concentração espermática: uma alíquota de sêmen de 5 μL era diluída em uma solução de formol-citrato em uma proporção de 1:200 ou 1:400, conforme o aspecto do sêmen indicava maior ou menor concentração. Uma fração de 10 μL era depositada em cada lado de uma câmara de Newbauer espelhada e contados cinco quadrantes de cada lado. Foi utilizada a fórmula padrão: $C = 5 \times 10 \times N \times D \times 10^3$ espermatozóides/ml. Onde C é a concentração, 5 é o número de quadrantes contados em cada lado da câmara, 10 é a altura entre câmara e lamínula, N é a média do número de espermatozóides contados em cada lado da câmara, D é o fator de diluição da amostra (200 ou 400) e 10^3 corresponde à transformação de mm^3 para ml.
- f) morfologia espermática: para determinação da morfologia espermática foi utilizada uma alíquota de 5 μL de sêmen mantida em 100 μL de solução formol-salina em ambiente resfriado (5°C) até a avaliação. Esta mistura era movimentada para evitar a aglutinação de espermatozóides. Para avaliação, uma fração da mesma era depositada sobre lâmina e recoberta com lamínula e eram analisados 200 espermatozóides, em microscópio de contraste de fase (Nikon®) sob aumento de 1000 x (CBRA, 1998).

4.7 PROCESSAMENTO E CONGELAMENTO DO SÊMEN

O sêmen sofria processamento pós-coleta para testar dois meios diluidores, o TYB frações r e f (Tabela 5 e 6) e o BIOXCELL (Tabela 7) e três curvas de resfriamento e congelamento. Após a retirada das alíquotas destinadas à análise, o sêmen residual era processado por uma, duas ou três metodologias, conforme o número de células viáveis disponíveis e doses obtidas.

Para calcular o volume de cada diluente adicionado, foi utilizada a fórmula descrita por TEBET (2004):

$$\text{Volume do diluente (ml)} = \frac{N}{D \times (C \times 10^6)}$$

Onde: N = nº total de espermatozóides móveis do ejaculado (concentração x volume x motilidade).

D = nº de diluentes utilizado.

C = concentração de espermatozóides x 10^6 por ml (20 ou 40×10^6).

Após o cálculo de doses, o sêmen era dividido em alíquotas a serem testadas.

O meio extensor BIOXCELL foi diluído em água bidestilada na proporção de 4:1, sendo utilizadas quatro partes de água bidestilada para uma parte de BIOXCELL. O produto então foi estocado em temperatura ambiente (20 °C) para utilização nas alíquotas processadas no decorrer do dia. A alíquota de sêmen destinada ao meio BIOXCELL foi centrifugada a 300 g por 10 min, o sobrenadante foi então removido e acrescentou-se o meio BIOXCELL diluído até atingir uma concentração de espermatozóides de 20 a 40×10^6 /ml. A amostra foi envasada em palhetas francesas, obtendo-se doses de 0,25 ml com 5 a 10×10^6 espermatozóides móveis, para o teste de resfriamento e congelamento.

TABELA 4 - COMPOSIÇÃO DO MEIO EXTENSOR *REFRIGERATION MÉDIUM* – TEST YOLK BUFFER® (IRVINE SCIENTIFIC, SANTA ANA, CA, EUA) – (TYB-R)

Composição	Concentração
TES	176 mM
Tris	80 mM
Dextrose	9 mM
Sulfato de gentamicina	10 µg/mL
Gema de ovo (SPF, "specific pathogen free") inativada pelo calor	20 %

TABELA 5 - COMPOSIÇÃO DO MEIO EXTENSOR *FREEZING MEDIUM* TEST YOLK BUFFER[®] (IRVINE SCIENTIFIC, SANTA ANA, CA, EUA) – (TYB-F)

Composição	Concentração
TES	176 mM
Tris	80 mM
Dextrose	9 mM
Sulfato de gentamicina	10 µg/ml
Glicerol	12%
Gema de ovo (SPF, "specific pathogen free") inativada pelo calor	20%

TABELA 6 - COMPOSIÇÃO DO MEIO EXTENSOR BIOXCELL[®] (IMV TECHNOLOGIES, L'AIGLE, FRANÇA) - (BIOXCEL)

Composição	Concentração
Tris	2,3 g/L
Citrato de sódio	6,2 g/L
Cloreto de potássio	0,8 g/L
Frutose	1,2 g/L
Monohidrato de lactose	0,2 g/L
Glicina	0,2 g/L
Glicose anidra	0,5 g/L
Taurina	0,005 g/L
Sulfato de gentamicina	0,24 g/L
Tartarato de tilosina	0,33 g/L
Lincospectina 100	0,383 g/L
Glicerol	40,2 g/L
Hidrato de cálcio lactato	0,7 g/L
Lecitina de soja	1,5 g/L
Monohidrato de ácido cítrico	2,5 g/L
Água ultrapura	0,065 L

Para o teste do meio TYB, a fração TYB-r do meio foi adicionada pré-centrifugação em volume igual ao do sêmen, realizou-se a centrifugação a 300 g por 10 min, para então o sobrenadante ser removido. O meio TYB foi adicionado com 50% da fração TYB-r e 50% da fração TYB-f, atingindo uma concentração de 20 a 40 x 10⁶ espermatozóides móveis/ml. A amostra foi envasada em palhetas francesas, obtendo-se doses de 0,25 ml com 5 a 10 x 10⁶ espermatozóides móveis,

para o teste de resfriamento e congelamento.

Este processo era realizado em sala com temperatura controlada a 20° C.

4.8 CURVAS DE RESFRIAMENTO E CONGELAMENTO

As curvas de resfriamento e congelamento foram testadas conforme a disponibilidade de doses obtidas em cada coleta, sendo uma curva chamada Rápida (RAP), uma curva descrita por TEBET (2004) (TEB) e uma curva processada no equipamento TK-3000 (TK).

Curva Rápida (RAP): As palhetas após o envase foram colocadas em um pequeno saco plástico, para serem imersas na água em Becker com 300 ml de água a 20 °C. Este recipiente foi colocado em refrigerador a 5 °C, durante três horas para resfriamento e equilíbrio. Após o equilíbrio, as amostras foram transferidas para caixa de isopor (18 x 15 x 22 cm) em um suporte metálico e mantidas por um minuto em vapor de nitrogênio a 8,3 cm da coluna líquida e mais um minuto a 3,0 cm da coluna líquida de nitrogênio, para então serem mergulhados em nitrogênio líquido, completando a etapa de congelamento.

Curva descrita por TEBET (2004) (TEB): As palhetas após envase foram colocadas em um pequeno saco plástico e imersas em água em tubo Becker com 300 ml de água a 20 °C, sendo então levado a um refrigerador a 5° C por três horas para resfriamento e equilíbrio. As palhetas foram então transferidas para uma caixa de isopor e permaneceram durante 20 min em vapor de nitrogênio líquido, a 6 cm da coluna líquida, depois dos quais foram mergulhados no mesmo.

Curva da máquina de congelação TK 3000 (TK): As palhetas após o envase foram acondicionadas no equipamento. O mesmo foi programado para resfriar as palhetas de 20°C até 5°C em uma hora, em uma taxa de resfriamento de 0,25 °C/min e, ao atingir esta temperatura, a coluna metálica do equipamento permanecia por mais uma hora e meia na temperatura de 5°C, para equilíbrio. Na sequência, o cilindro metálico, onde estavam alojadas as amostras, foi mergulhado em 5 cm de nitrogênio líquido e iniciava-se o processo de congelamento programado no equipamento, a uma taxa de – 20 °C/min até atingir a temperatura de –120 °C, quando então as palhetas foram mergulhadas em nitrogênio líquido, completando a etapa de congelamento.

FIGURA 4 - EQUIPAMENTO DE CONGELAÇÃO DE SÊMEN TK-3000®



4.9 ANÁLISE DAS AMOSTRAS PÓS-CONGELAMENTO

O sêmen processado foi estocado em nitrogênio líquido para análise e o tempo de estocagem sempre foi superior a 21 dias.

O descongelamento foi realizado mergulhando as palhetas durante 30 s em água aquecida a 37 °C. A seguir, as amostras foram analisadas quanto a motilidade (0 a 100%) e vigor espermático (0 – 5), conforme descrito no item avaliação do sêmen. Com os dados de motilidade e vigor foi calculado o IMP para cada amostra e a variação relativa (%) dos momentos *in natura* e pós-congelado, das curvas de resfriamento-congelamento e dos meios diluentes testados.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para os resultados descritos foram realizados testes de média e medidas de dispersão. Para os testes de protocolos anestésicos e congelamento foram realizadas testes ANOVA em delineamento inteiramente casualizado e quando havia resultados diferentes realizou-se o teste de Tukey. O nível de confiança adotado para a significância foi de 5% ($p < 0,05$). Quando se obteve nível de confiança entre 5 e 10% ($0,05 < p < 0,10$), embora o resultado não fosse significativo, foi indicativo de necessidade de aumento do tamanho da amostra para uma definição mais objetiva, quando o nível de segurança foi superior a 10% ($p > 0,10$), a diferença dos resultados

foi considerada não significativa. O teste t de Student com $\alpha = 0,05$ foi utilizado para comparação de amostras pareadas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO DO EXPERIMENTO 1 - CONTENÇÃO QUÍMICA PARA COLHEITA DE SÊMEN EM GATO-DO-MATO-PEQUENO (*Leopardus tigrinus*)

Foram realizados 33 procedimentos anestésicos em gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*, n=12), divididos em três etapas:

- a) primeira etapa (P1) – 10 anestésias com 0,67 mg/kg de cloridrato de xilazina e 6,7 mg/kg de cloridrato de tiletamina/zolazepan;
- b) segunda etapa (P2) – 12 anestésias com 0,9 mg/kg de cloridrato de xilazina e 6,7 mg/kg de cloridrato de tiletamina/zolazepan;
- c) terceira etapa (P3) – 11 anestésias com 1,3 mg/kg de cloridrato de xilazina e 6,7 mg/kg de cloridrato de tiletamina/zolazepan.

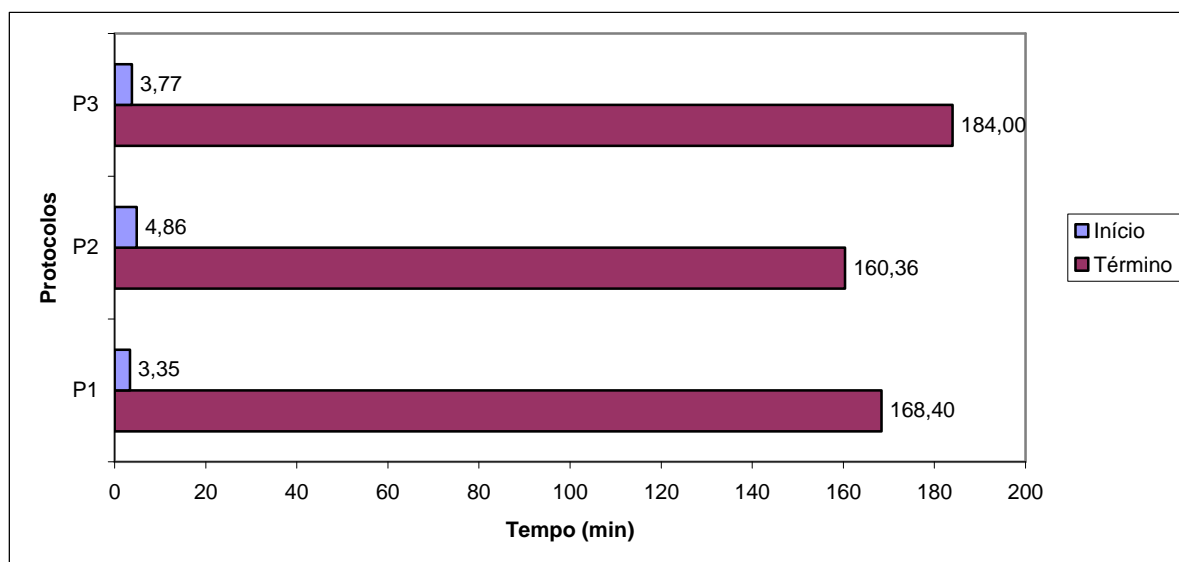
Um animal foi afastado do experimento após detecção de um sopro cardíaco, provavelmente de origem mitral, com subsequente desenvolvimento de edema pulmonar. Neste caso foi administrado imediatamente 0,5 mg de ioimbina (antagonista α -2) que promoveu a reversão farmacológica do sedativo α -2 agonista. O quadro foi estabilizado, houve a recuperação anestésica do animal e o mesmo foi encaminhado para tratamento clínico da insuficiência cardíaca.

O tempo médio de indução anestésica, considerado pela perda da reação de endireitamento postural (REP) \pm EPM foi de: 3,35 \pm 0,33 min para P1; 4,86 \pm 0,64 min para P2 e 3,77 min \pm 0,30 min para P3. O término da anestesia foi considerado quando ocorreu o retorno do nível de consciência do animal, sendo que os tempos médios foram de 168,40 \pm 14,47 min para P1; 160,36 \pm 12,65 min para P2 e 184,00 \pm 10,00 min para P3, considerados estatisticamente iguais ($p>0,10$).

Em situações onde os animais apresentaram um plano anestésico superficial, com retorno do nível de consciência, vocalização ou com miorrelaxamento ou sensibilidade classificados como C, antes ou durante o procedimento de eletroejaculação foi aplicada dose suplementar de anestésico calculada em 50% da dose inicial. Este procedimento foi necessário em dois animais

no protocolo P1, em um animal no protocolo P2 e em dois animais em P3.

GRÁFICO - 1 TEMPOS MÉDIOS DE INDUÇÃO ANESTÉSICA E TÉRMINO DE ANESTESIA UTILIZANDO TRÊS PROTOCOLOS (P1, P2 E P3) COM DIFERENTES DOSAGENS DE FÁRMACOS



A colheita de sêmen foi eficaz em todos os indivíduos submetidos ao protocolo anestésico, sendo que os mesmos apresentaram presença de espermatozóides em todos os ejaculados.

O início da colheita de sêmen por eletroejaculação ocorreu no tempo médio (\pm EPM) de $36,25 \pm 1,60$ min e o final no tempo médio de $54,38 \pm 2,34$ min.

De um total de 32 colheitas, houve contaminação por urina em 10 colheitas (31,2%) e em 18 alíquotas (7%), as quais foram desprezadas, não inviabilizando a análise e o processamento do sêmen. A contaminação por urina ocorreu em dois ejaculados e quatro alíquotas em P1, em cinco ejaculados e oito alíquotas em P2 e em três ejaculados e seis alíquotas em P3, ou seja nas três dosagens testadas ocorreu este fenômeno, com maior prevalência no P2.

Não se sabe se o procedimento de eletroejaculação causa dor, mas supõe-se que cause certo grau de desconforto e sensibilidade muscular, pelo excesso de contração ocasionada pelos estímulos elétricos. Este fato justifica que a qualidade da anestesia deve ser suficiente para executar a colheita de sêmen com eficácia e promove analgesia ao animal durante o procedimento.

Diante destes fatos optou-se por trabalhar com o protocolo de

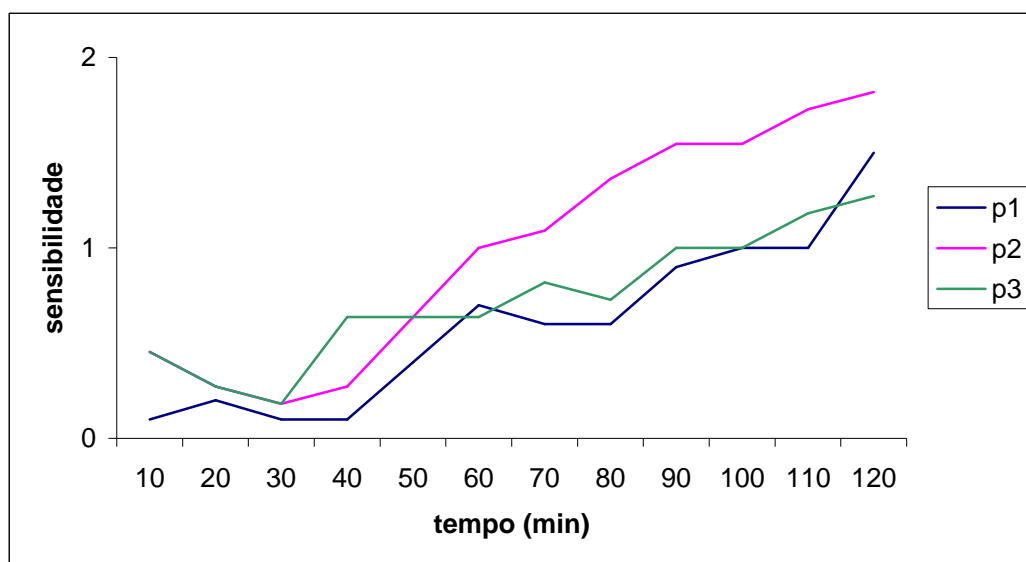
monitoramento proposto por PACHALY (1998) que faz uma mensuração algimétrica por compressão do periósteo falangiano com uma pinça hemostática e avaliação do miorelaxamento em membros torácicos e pélvicos, além do controle dos demais parâmetros fisiológicos.

No presente estudo, a primeira alteração perceptível de superficialização do plano anestésico foi a sensibilidade de compressão de periósteo em membro torácico, fato que se repetiu em 31 das 32 anestésias monitoradas.

Avaliando os três protocolos, não houve diferença significativa de sensibilidade de membro torácico entre momentos anteriores e durante a eletroejaculação ($p \geq 0,10$), caracterizando assim a eficácia dos protocolos em abolir a dor durante a colheita de sêmen.

Considerando ainda a sensibilidade de membro torácico, o protocolo P2 apresentou níveis de sensibilidade um pouco acima do P1, porém isto só foi verificado após o momento 70 min, subsequente ao procedimento da eletroejaculação ($p \leq 0,05$) (Gráfico 2).

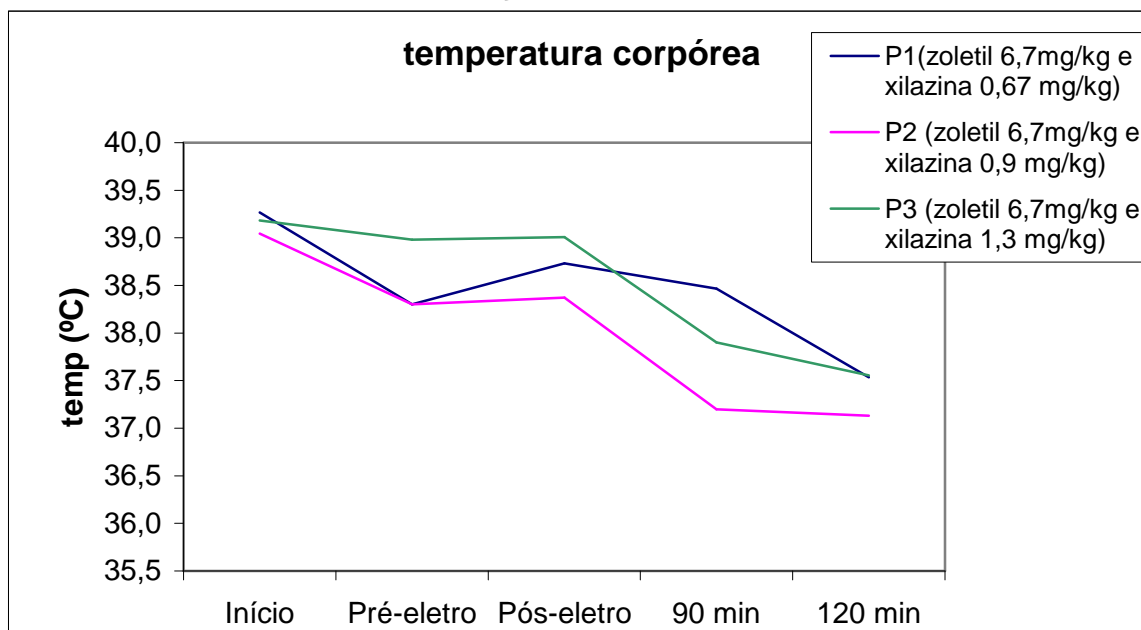
GRÁFICO - 2 SENSIBILIDADE DOLOROSA DO MEMBRO TORÁCICO AO LONGO DO TEMPO



Legenda: 0 – Ausência dolorosa = A
 1 – Leve sensibilidade dolorosa = B
 2 – Grande sensibilidade dolorosa = C

As médias das temperaturas retais mantiveram-se dentro de parâmetros fisiológicos (Gráfico 3).

GRÁFICO - 3 TEMPERATURA MÉDIA NAS ETAPAS DO PROCEDIMENTO DE ELETROEJACULAÇÃO EM P1, P2 E P3



A frequência respiratória (FR) dos animais anestesiados aumentou durante a eletroejaculação, comparada com valores anteriores ao procedimento ($p \leq 0,05$). Houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre P1 e P2 nas médias de FR, sendo as FR médias de P2 superiores a P1, (Gráfico 4).

Nas frequências cardíacas observaram-se diferenças significativas entre os protocolos P1 e P3 em 50 min ($p \leq 0,05$) e diferença significativa entre P1 e P2 com P3 nos momentos 60 e 70 min ($p \leq 0,05$). Esta diferença é evidenciada durante e no final da eletroejaculação (Gráfico 5). Embora isso tenha sido verificado, todas as mensurações estiveram dentro de níveis seguros.

GRÁFICO - 4 FREQUÊNCIA RESPIRATÓRIA MÉDIA EM P1, P2 E P3

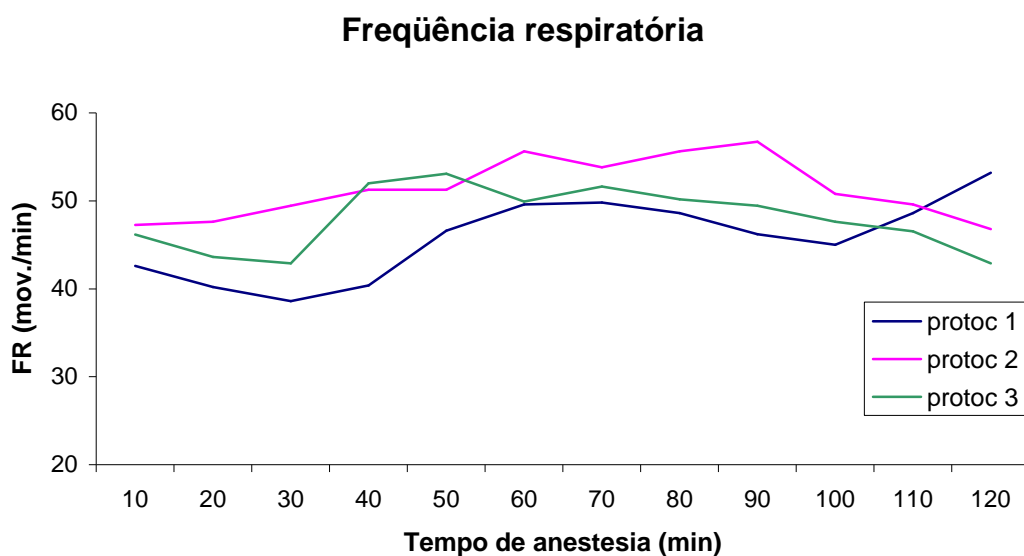
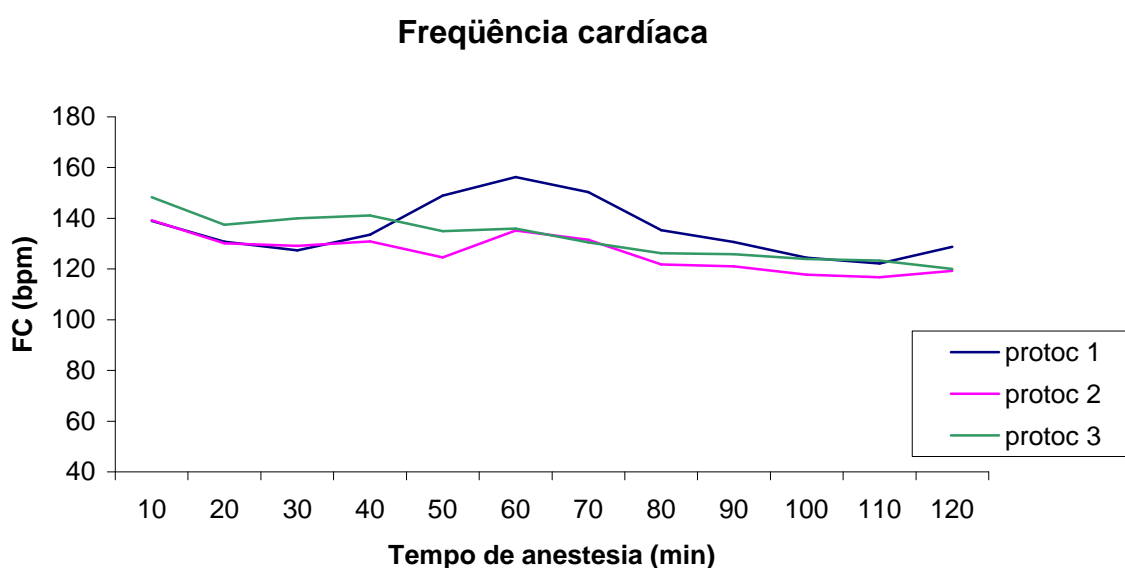


GRÁFICO - 5 FREQUÊNCIA CARDÍACA MÉDIA EM P1, P2 E P3



A segurança do protocolo anestésico, também pôde ser comprovada no momento em que foi detectada uma alteração clínica em um dos animais do experimento e a anestesia foi revertida com aplicação de ioimbina.

A ioimbina, na dose de 0,5 mg por gato, foi descrita para reversão do protocolo anestésico contendo cloridrato de tiletamina/zolazepan, cloridrato de cetamina e cloridrato de xilazina em cirurgias de castrações de felinos (CISTOLA et al., 2004).

PACHALY et al. (2002a) descreveram tempos médios de anestesia menores

com retorno à consciência em $90,90 \pm 39,10$ min com dosagens de tiletamina/zolazepan similares (6,94 mg/kg) e cloridrato de xilazina maiores (2,77 mg/kg). Isto pode ser associado ao fato dos autores terem associado o uso de sulfato de atropina nos animais, o que diferiu do protocolo do presente experimento. CISTOLA et al. (2004) reportaram o uso de um protocolo anestésico similar em felinos domésticos, porém com a associação de cloridrato de cetamina além dos fármacos descritos, o qual mostrou um tempo anestésico de 72 ± 42 min, porém com reversão por ioimbina, que diminui o tempo de recuperação anestésica. Ambas as pesquisas revelaram uma boa segurança no uso destes fármacos, sendo reportado por PACHALY et al. (2002b) apenas uma intercorrência em gato-do-mato-pequeno, com quadro de distúrbio psicomotor, o qual foi posteriormente estabilizado.

TEBET (2004) relatou um índice de 53% de ejaculados com contaminação por urina em gato-do-mato-pequeno, QUEIROZ (2003) obteve 75% de ejaculados contaminados por urina em jaguatiricas e MORATO et al. (1998) obteve índice de 3,7% de contaminação no ejaculado em onças (*Panthera onca*). Esses dados apontam para uma eficácia de colheita melhor em grandes felídeos. TEBET (2004) sugeriu a possibilidade do posicionamento mais cranial do transdutor associado ao protocolo anestésico utilizado e a profundidade maior ou menor dos planos anestésicos ocasionarem este problema.

GROSS (2003) observou que em colheitas de sêmen de touros, sedados com cloridrato de xilazina, ocorreu uma diminuição da eficácia da droga à medida que se repetiam as aplicações, havendo necessidade de ampliar a dosagem em sedações subseqüentes. O autor sugeriu a possibilidade de que uma indução da atividade enzimática microsomal possa ter ocorrido, ocasionando uma metabolização mais rápida do fármaco. Este fato pode explicar o resultado em que os animais submetidos ao protocolo P2, com dose de cloridrato de xilazina (0,9 mg/kg) maior que a dose de P1 (0,67 mg/kg), apresentaram uma sensibilidade maior de membro torácico após o momento 70 min.

Outro fato identificado foi um pequeno aumento da temperatura corpórea durante a eletroejaculação, fato que é justificado pela contração muscular, ocorrendo queda da temperatura subseqüente ao evento, pela ação hipotensora dos fármacos. SANTOS et al. (2004) relataram uma queda progressiva da temperatura corpórea em animais submetidos à anestesia dissociativa, porém sem ação de estímulos

externos

As médias das frequências respiratórias mantiveram-se dentro de níveis aceitáveis para o procedimento anestésico, embora tenham sido relatado frequências respiratórias um pouco menores para o gato-maracajá (*Leopardus wiedii*) $29,87 \pm 7,23$ (PACHALY et al., 2002a) e gato doméstico (*Felis catus*) 18 ± 8 (CISTOLA et al., 2004), respectivamente. Uma hipótese levantada foi um menor controle da sensibilidade dolorosa identificada em P2 após a eletroejaculação, que pôde propiciar um aumento na FR, também em P2 .

Os valores encontrados para frequência cardíaca estiveram dentro de parâmetros descritos por outros autores em anestésias de felídeos. PACHALY et al. (2002a) descreveram valores de $122,13 \pm 16,55$ bpm (batimentos por minuto) para frequência cardíaca em gato-maracajá anestesiado com protocolo similar. CISTOLA et al. (2004) encontraram valores de 156 ± 19 bpm para frequência cardíaca de gatos domésticos, submetidos à anestesia dissociativa.

Em síntese, os três protocolos com dosagens diferentes de cloridrato de xilazina mostraram-se efetivos para colheita de sêmen e abolição da dor durante o procedimento. Apresentaram segurança na aplicação, com possibilidade de reversão quando necessária, utilizando fármacos disponíveis no mercado nacional e com custo acessível.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO DO EXPERIMENTO 2 - ANÁLISE DESCRITIVA EXPLORATÓRIA DE PARÂMETROS CLÍNICOS E ANDROLÓGICOS DE GATO-DO-MATO-PEQUENO (*Leopardus tigrinus*)

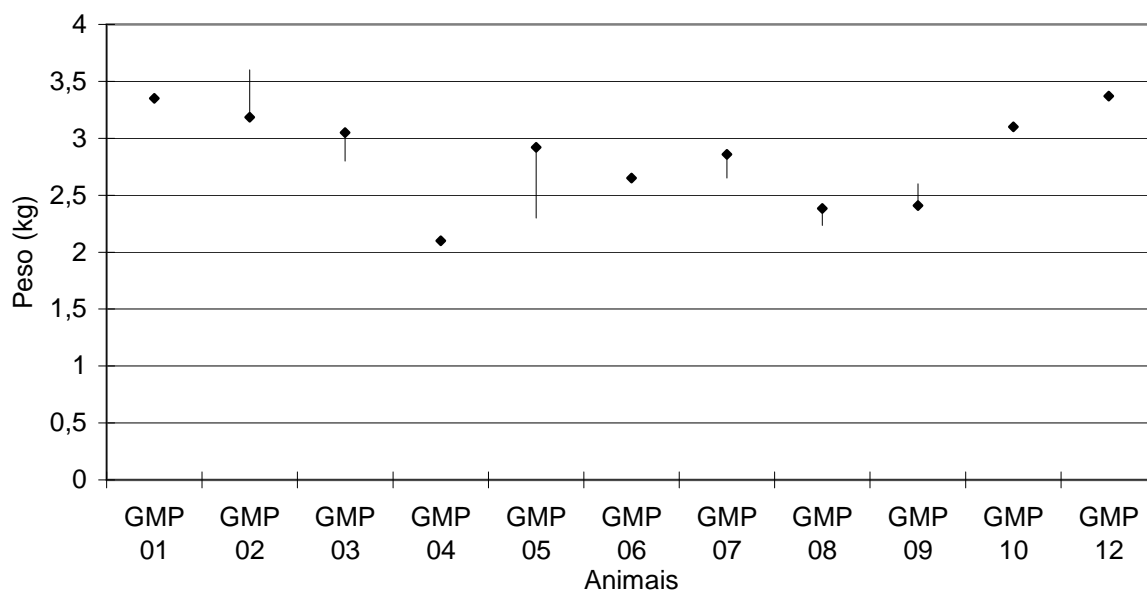
Embora o objetivo principal deste trabalho tenha sido a avaliação andrológica, o número de publicações envolvendo parâmetros físicos e clínicos de gato-do-mato-pequeno é limitado (OLIVEIRA et al., 2001; CORREA, 1999; MONTEIRO-FILHO; LUCAS, 2004). Portanto, será feita uma descrição dos parâmetros físicos e hematológicos encontrados, bem como, das alterações clínicas detectadas nos animais que participaram do experimento (n = 12).

6.1 EXAME CLÍNICO

6.1.1 Peso Corporal

Os gatos-do-mato-pequeno apresentaram peso médio (\pm EPM) de $2,82 \pm 0,08$ kg, ficando entre as médias (\pm DP) encontradas por TEBET (2004) – $2,2 \pm 0,4$ kg e MORAIS et al. (2002) – 3,0 kg, todas dentro da faixa esperada para a espécie (PARANÁ, 2004) que é de 1,5 a 3,0 kg. Houve pequenas variações de peso com o mesmo indivíduo entre as coletas (Gráfico 6), sem entretanto, serem relatadas alterações de dieta, ambiente ou saúde.

GRÁFICO - 6 VARIAÇÃO DE PESO DOS ANIMAIS DURANTE O EXPERIMENTO



6.1.2 Exame Clínico

No exame clínico foi observado bom estado nutricional dos animais e ausência de ectoparasitoses. Em quatro exemplares (GMP 6, GMP 07, GMP 11 e GMP 12), na avaliação da cavidade bucal, foram detectadas fraturas em dentes caninos, com exposição pulpar, sendo que dois destes (GMP 07 e GMP 11) também apresentavam um quadro de periodontite severa. Trata-se de uma condição freqüente em carnívoros mantidos em cativeiro, sendo ocasionada por traumas, dieta e ação de microorganismos invasores do periodonto (PACHALY; GIOSO, 2001). Cinco animais (GMP 1, GMP 2, GMP 3, GMP 4 e GMP 6) apresentavam periodontite leve.

Um animal (GMP 09) apresentava uma fratura antiga com não união óssea em tíbia e fíbula direita, sem, no entanto, demonstrar desconforto doloroso quando observado no recinto. De acordo com o controle da instituição e ficha individual do animal, o mesmo já reproduziu, ainda que apresentando este problema.

Foi detectada em dois animais (GMP 01 e GMP 08) lesão dermatológica por lambedura e arrancamento de pelos. Este problema também é relatado por OLIVEIRA et al. (2001), estando relacionado entre alguns dos distúrbios mais comuns de felídeos em cativeiro.

Um animal (GMP 01) apresentou uma hérnia umbilical pequena, com conteúdo herniário aderido à parede abdominal, sem complicações clínicas.

Em um gato-do-mato-pequeno (GMP 11) foi diagnosticado um sopro cardíaco sistólico, com provável origem em válvula mitral, este animal foi anestesiado para o processo de colheita de sêmen por eletroejaculação, desencadeando um início de edema pulmonar, que foi revertido com o uso de medicamentos. O procedimento de colheita foi abortado e o animal foi afastado do experimento.

O animal GMP 12 não esteve presente na primeira série de colheitas por condições epidemiológicas, por estar em recinto próximo a outros animais que apresentaram quadro de diarreia infecciosa e, após período de quarentena, foi reintegrado ao experimento.

As variações de frequência cardíaca e respiratória encontram-se junto ao experimento anestésico, pois as verificações foram realizadas com os animais sob contenção farmacológica.

6.1.3 Hematologia

Valores hematológicos são de grande valia na interpretação de quadros clínicos. As informações sobre valores de contagem celular para a espécie são escassas na literatura e a comparação com gatos domésticos pode não ser eficiente, por apresentar valores estatisticamente diferentes da espécie em questão (MONTEIRO-FILHO; LUCAS, 2004).

Foram analisadas 20 amostras provenientes de 10 animais, sendo que nenhum apresentava sinais clínicos de doenças infecciosas. Os resultados são apresentados na Tabela 7.

Quanto ao número de hemácias, os resultados aproximam-se do encontrado por CORREA (1999) – $5,82$ a $8,24 \times 10^6/\text{mm}^3$, mas estão abaixo dos valores relatados por MONTEIRO-FILHO e LUCAS (2004) – $6,2$ a $11,0 \times 10^6/\text{mm}^3$. Nas células brancas (leucócitos) os valores obtidos estão muito próximos aos descritos por CORREA (1999) – $4,1$ a $9,6 \times 10^3/\text{mm}^3$, porém MONTEIRO-FILHO e LUCAS (2004) encontraram uma amplitude maior nos resultados – $3,5 - 16,6 \times 10^6/\text{mm}^3$, sendo que os valores descritos na Tabela 7 estão contidos neste intervalo. Nas

contagens diferenciais, os números relatados são aproximados entre os autores e o resultado descrito na Tabela 7, com exceção do número mínimo de linfócitos ($306 \times 10^3/\text{mm}^3$) que ficou abaixo do descrito por CORREA (1999) – $907 \times 10^3/\text{mm}^3$ e por MONTEIRO-FILHO e LUCAS (2004) – $580 \times 10^3/\text{mm}^3$.

TABELA 7 - VALORES HEMATOLÓGICOS ENCONTRADOS EM GATO-DO-MATO-PEQUENO (*Leopardus tigrinus*, n=20/2*)

	Média \pm (DP) (Min - Máx.)
Hemácias ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	$6,35 \pm 1,1$ (4,33 - 7,85)
Hematócrito (%)	$39,05 \pm 3,3$ (32 - 45)
Hemoglobina (g/dL)	$12,90 \pm 1,9$ (8,92 - 16,66)
VGM (fl)	$63,56 \pm 13,8$ (45,07 - 92,37)
HGM (pg)	$20,75 \pm 3,8$ (15,44 - 28,19)
CHGM (%)	$33,33 \pm 4,3$ (22,75 - 41,15)
Leucócitos totais ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	$7,34 \pm 1,7$ (4,45 - 10,30)
Mielócitos ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	0
Metamielócitos ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	0
Bastonetes ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	0
Segmentados ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	$5927,30 \pm 1467,9$ (3560 - 9020)
Eosinófilos ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	$144,64 \pm 138,5$ (44 - 567)
Basófilos ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	Raros
Linfócitos ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	$1157,2 \pm 560,3$ (306 - 2475)
Monócitos ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	$170,00 \pm 90,7$ (57 - 410)

* n = Número de indivíduos/número de colheitas.

6.2 EXAME ANDROLÓGICO

6.2.1 Exame Externo

Na avaliação morfológica do aparelho genital, foram encontrados pênis de aspecto normal, com inserção posterior, presença de espículas penianas em todos

os indivíduos e ausência de aderências ou frênulo persistente. Segundo MORAIS (2001), estes dados são considerados normais para a espécie e a presença de espículas penianas é indicativa de produção de testosterona.

Todos os animais submetidos à eletroejaculação neste estudo responderam com ereção peniana.

A consistência testicular encontrada na maioria dos animais foi a fibroelástica, com exceção de um indivíduo (GMP 12), que apresentou consistência levemente mais flácida em comparação aos demais indivíduos. É importante destacar que este animal apresentou a menor média de concentração de espermatozoides ($31,25 \times 10^6/\text{ml}$) e a menor média de espermatozoides viáveis por ejaculado ($2,25 \times 10^6$) do grupo (Tabela 8).

Este fato destaca a importância da avaliação do aparelho reprodutor durante a avaliação andrológica, como um indicativo da capacidade reprodutiva. No entanto, o fato destas características se apresentarem normais não exclui a possibilidade de afecções reprodutivas. Quanto à consistência do testículo, alterações na mesma podem ser um indicativo de algumas afecções nas gônadas, como a hipoplasia ou a fibrose, as quais podem estar associadas a diversos quadros mórbidos que podem comprometer a esteroidogênese e a espermatogênese (QUEIROZ, 2003).

A média (\pm EPM) do volume testicular total (VTT) encontrado nestes animais foi $2,30 \pm 0,12 \text{ cm}^3$. Estes valores estão abaixo das médias encontradas por MORAIS et al. (2002) – $4,2 \pm 0,2 \text{ cm}^3$, porém mais próximos das médias descritas por SWANSON et al. (2003) – $2,8 \pm 0,3 \text{ cm}^3$; e das médias (\pm DP) encontradas por TEBET (2004) – $2,9 \pm 0,7 \text{ cm}^3$. Quando se faz a média do volume testicular corrigido para o peso corporal, foi encontrado um valor para média (\pm EPM) de $0,84 \pm 0,05 \text{ cm}^3.\text{kg}^{-1}$, enquanto TEBET (2004) encontrou $1,35 \text{ cm}^3.\text{kg}^{-1}$ e MORAIS et al. (2002) encontrou $1,4 \text{ cm}^3.\text{kg}^{-1}$. QUEIROZ (2003) aponta como causa principal das diferenças nos valores encontrados em mensurações a falta de padronização. O presente estudo teve por base a metodologia descrita por QUEIROZ (2003), no qual efetua-se a mensuração com paquímetro nos eixos látero-lateral e comprimento, aplicando-se a fórmula descrita no item Material e Métodos.

6.2.2 Ejaculado

Obteve-se colheita efetiva de sêmen em todas as vezes que os animais foram submetidos à eletroejaculação, com possibilidade de avaliação espermática em 100% das colheitas.

As colheitas foram realizadas nos meses de setembro a dezembro de 2004. No verão há um aumento na produção de espermatozóides em gato-do-mato-pequeno e gato-maracajá, porém não há alterações significativas na morfologia espermática ao longo das estações do ano, bem como os machos destas espécies mantêm capacidade reprodutiva o ano todo (MORAIS et al., 2002).

Em relação ao aspecto do ejaculado, observou-se uma variação de translúcido a leitoso, sendo este último o mais concentrado. Em algumas ocasiões foram obtidas frações de ejaculado com coloração amarela, que indica contaminação por urina, sendo confirmado pelo pH com valores inferiores a 7,0.

Foi observado em algumas amostras que após alguns minutos houve uma leve alteração na cor do sêmen, passando da cor original para uma coloração levemente rósea, esta observação também foi descrita por TEBET (2004).

Houve contaminação por urina em 10 ejaculados (31,2%), em uma sub-série ou outra, sendo que a alíquota contaminada era desprezada da amostra, não inviabilizando a colheita do animal. A contaminação por urina é freqüente em colheitas de sêmen por eletroejaculação em felídeos (PLATZ et al., 1978, MORAIS et al., 2002; SWANSON et al., 1996a; TEBET, 2004), sendo que TEBET (2004) cogita a hipótese de que determinadas associações farmacológicas empregadas para anestesia e a colocação mais cranial da sonda de eletroejaculação predispõem a este evento. QUEIROZ (2003) relatou um alto índice de contaminação por urina (75%) em jaguatiricas, durante a colheita de sêmen e formula a hipótese da variação individual e de espécies na inervação autonômica que regula o processo.

O pH médio (\pm EPM) encontrado foi de $7,58 \pm 0,07$, descartando-se as alíquotas visivelmente contaminadas por urina, sendo semelhante ao encontrado por MORAIS et al. (2002) – $7,6 \pm 0,1$ e TEBET (2004), média (\pm DP) – $7,7 \pm 0,1$.

Os dados referentes ao volume total do ejaculado referem-se à soma das alíquotas obtidas nas 8 séries de 10 estímulos, durante o processo de eletroejaculação, descontadas as alíquotas contaminadas por urina, que foram desprezadas. O volume médio (\pm EPM) encontrado foi de $0,13 \pm 0,20$ ml (Tabela 8),

sendo menor que o observado (média \pm DP) por TEBET (2004) – $0,16 \pm 0,1$ ml e MORAIS et al. (2002) - (média \pm EPM) $0,30 \pm 0,1$ ml e maior que o descrito por SWANSON et al. (2003) – (média \pm EPM) $0,11 \pm 0,02$ ml. Há que se ressaltar que a amplitude dos valores de volume foi alta, variando de 0,02 ml a 0,53 ml, com um coeficiente de variação (CV) de 89,5 %.

TABELA 8 - MÉDIAS (\pm EPM) DO VOLUME DO EJACULADO (VOL), CONCENTRAÇÃO ESPERMÁTICA (CONC.), TOTAL DE ESPERMATOZÓIDES POR EJACULADO (TOTAL SP) E NÚMERO DE CÉLULAS VIÁVEIS POR EJACULADO (VIÁVEIS)

Animal	Vol. (ml)	Conc. (x 10 ⁶ /ml)	Total sp (x 10 ⁶)	Viáveis (x 10 ⁶)
GMP 1 (³)	0,10 \pm 0,3	198,33 \pm 33,9	19,27 \pm 7,8	13,69 \pm 8,9
GMP 2 (³)	0,16 \pm 0,7	376,83 \pm 236,6	88,57 \pm 74,8	79,01 \pm 67,7
GMP 3 (³)	0,09 \pm 0,4	304,17 \pm 185,7	39,50 \pm 34,6	34,53 \pm 31,7
GMP 4 (³)	0,03 \pm 0,1	632,83 \pm 251,0	24,15 \pm 17,3	20,05 \pm 16,3
GMP 5 (³)	0,40 \pm 0,9	228,67 \pm 33,1	91,27 \pm 29,3	77,95 \pm 28,2
GMP 6 (³)	0,11 \pm 0,4	766,50 \pm 301,7	97,87 \pm 71,5	86,32 \pm 65,2
GMP 7 (³)	0,09 \pm 0,1	416 \pm 143,2	42,93 \pm 18,5	37,19 \pm 15,8
GMP 8 (³)	0,11 \pm 0,2	129,17 \pm 68,7	14,50 \pm 7,6	11,09 \pm 6,5
GMP 9 (³)	0,04 \pm 0,5	1441,33 \pm 674,3	63,77 \pm 35,3	50,67 \pm 28,5
GMP 10 (³)	0,21 \pm 0,45	140,33 \pm 65,5	29,33 \pm 15,8	23,71 \pm 12,6
GMP 12 (²)	0,10 \pm 0,2	31,25 \pm 27,3	3,80 \pm 3,5	2,25 \pm 2,1
Médias (\pm EPM)	0,13 \pm 0,20	436,41 \pm 95,77	48,16 \pm 11,08	40,85 \pm 9,97

Quanto à concentração do ejaculado, foi encontrada uma média (\pm EPM) de $436,41 \pm 95,77$, estando acima das concentrações médias descritas por SWANSON et al. (2003) – $83,0 \pm 35,5$; próxima à descrita por MORAIS et al. (2002) – $411,9 \pm 46,3$ e um pouco acima da descrita (média \pm DP) por TEBET (2004) – $296,1 \pm 143,1$. Deve-se salientar que alguns animais pesquisados por MORAIS et al. (2002) foram provenientes da mesma instituição em que foram coletados os dados deste trabalho. Ainda sobre a concentração do ejaculado, deve-se observar que foi encontrada uma grande amplitude de valores, também descrita pelos outros autores, ao apontarem o

erro padrão da média, desvio padrão ou amplitude de seus dados (SWANSON et al., 2003; TEBET, 2004; MORAIS et al., 2002).

Um dado importante é que os machos que estavam com fêmeas no recinto (GMP 2, GMP 5 e GMP 6) apresentaram os maiores números totais de espermatozóides por ejaculado de todo o grupo pesquisado, embora não houve diferenças estatísticas entre as médias ($p > 0,10$).

Em pesquisa realizada por SWANSON et al., (2003) verificou-se que machos vivendo sozinhos ou pareados com fêmeas apresentaram um número total maior ($p < 0,05$) de espermatozóides por ejaculado que machos coabitando com outros machos ou outras espécies no mesmo recinto.

SWANSON et al. (2003) apresentaram em tabelas, as amplitudes de concentração seminal de felídeos mantidos em zoológicos latino-americanos, sendo encontrados em quase todas as espécies pesquisadas, animais azoospermicos. No presente trabalho, todas as colheitas realizadas apresentaram contagens de espermatozóides, não sendo encontrado nenhum animal azoospermico.

Todas as comparações que envolvem volume e número total de espermatozóides no ejaculado são especulativas, principalmente quando desconsideramos a diferença dos protocolos para eletroejaculação (TEBET, 2004).

A motilidade média (\pm EPM) encontrada foi de $73,44 \pm 3,71$ %, com um vigor médio (\pm EPM) $3,48 \pm 0,11$, valores ligeiramente inferiores ao descrito por TEBET (2004) – (76,27% e 4,12) e equivalentes ao descritos por MORAIS et al. (2002) – (73,5% e 3,4), porém observa-se que os autores (QUEIROZ, 2003; TEBET, 2004 e MORAIS et al., 2002) apontam o índice de motilidade progressiva, descrito por HOWARD (1986), como uma medida para comparar as análises entre diversos autores, que é dado pela fórmula:

$$\text{IMP} = (\text{mot \%} + (V \times 20)) / 2$$

Onde: mot é a porcentagem de espermatozóides móveis
V é o vigor espermático.

Comparando-se os valores médios (\pm EPM) do IMP $69,39 \pm 3,54$, observa-se que o valor encontrado é inferior aos descritos por TEBET (2004) – (79,3) e MORAIS et al. (2002) – (74,1), porém estão acima da média descrita por SWANSON et al. (2003), que foi de 62,1. Vale ressaltar que os valores descritos por SWANSON et al.

(2003), para esta e demais variáveis, representam a média de indivíduos investigados em diversos zoológicos da América Latina, em um número de 17 machos de gato-do-mato-pequeno; enquanto os demais autores: TEBET, (2004) e MORAIS et al. (2002), trabalharam com um número menor de indivíduos, cinco e quatro machos de gato-do-mato-pequeno, respectivamente, tornando a amostragem de SWANSON et al. (2003) mais representativa para a espécie.

O IMP apresentou um coeficiente de variação (CV) de 28,8% entre todas as colheitas dos 11 machos e um coeficiente de variação médio de 18,5%, quando analisados dentro das amostras do mesmo indivíduo, caracterizando que a variação neste índice é pequena entre as colheitas do mesmo animal.

TABELA 9 - MÉDIAS (\pm EPM) DE PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS ENCONTRADOS NO SÊMEN DE GATO-DO-MATO-PEQUENO (*Leopardus tigrinus*, n=11)

Espécie	Motilidade (%)	Vigor (0-5)	Índice mot. progressiva	pH	Espermatozóides normais (%)
<i>L. tigrinus</i>	73,44 \pm 3,71	3,48 \pm 0,11	69,39 \pm 3,54	7,58 \pm 0,07	55,86 \pm 3,34

A avaliação morfológica dos espermatozóides presentes nos ejaculados foi realizada em todas as colheitas seminais realizadas. Foi encontrada uma quantidade significativa de defeitos morfológicos em espermatozóides avaliados (44,1% em média) a partir dos ejaculados obtidos neste estudo.

Caracteriza-se teratospermia como sendo uma porcentagem menor que 40% de espermatozóides normais presentes ao ejaculado e normospermia como uma quantidade maior que 60% de espermatozóides normais presentes no ejaculado (NEUBAUER et al., 2004 ; PUKAZHENTHI et al., 2001).

A teratozoospermia freqüentemente está presente em felídeos, incluindo certos gatos domésticos, mas os mecanismos celulares e moleculares que provocam este fenômeno são desconhecidos (NEUBAUER et al., 2004).

Em felídeos as anormalidades espermáticas predominantes incluem os defeitos de peça intermediária, com ou sem gota citoplasmática, cauda dobrada e cauda enrolada (PUKAZHENTHI, 2001).

No presente estudo, em 11 animais avaliados, podemos caracterizar como teratozoospermicos (< 40% de espermatozóides normais) apenas dois animais,

sendo que também, apenas três animais foram caracterizados como normospérmicos (> 60% de espermatozóides normais), por apresentarem estas características em todos os ejaculados. Os demais animais variaram os índices de pleomorfismo espermático entre uma colheita e outra. Estes dados coincidem com as observações de SWANSON et al. (2003) que citam em puma, gato-maracajá, gato-do-mato-pequeno e gato-mourisco uma grande variação no índice de pleomorfismo espermático nos animais investigados.

É especialmente importante o estudo da teratozoospermia, que comumente ocorre em 70% das espécies ou subespécies de felídeos estudados até a presente data (PUKAZENTHI et al., 2001).

A incidência de pleomorfismo entre as três espécies (*L. tigrinus*, *L. wiedii* e *L. pardalis*) é alta, entretanto as anormalidades específicas diferem entre as espécies (MORAIS et al., 2002).

O número médio de espermatozóides morfológicamente normais (\pm EPM) $55,86 \pm 3,34$ (Tabela 10) está entre as médias encontradas por MORAIS et al. (2002) – ($59,2\% \pm 3,5$) e TEBET (2004) – ($52,1\%$). Já SWANSON et al. (2003) descreveram um baixo índice ($35,6\% \pm 6,0$) de espermatozóides normais para o gato-do-mato-pequeno.

Os defeitos mais freqüentemente encontrados no presente trabalho foram a cauda fortemente dobrada (13,2%), seguido de cauda dobrada/enrolada (5,4%). AXNÉR (1998) relatou um aumento de defeitos de cauda em espermatozóides coletados por eletroejaculação em gatos, quando comparados a coletas de epidídimo sem o uso de eletroejaculador. Este relato pode explicar o aumento deste defeito no estudo. TEBET (2004) relatou uma maior incidência de defeitos como cauda dobrada (12,5%), cauda enrolada (10,9%) e cauda fortemente dobrada (10,9%). MORAIS et al. (2002) relataram como defeito mais freqüentemente encontrado a peça intermediária dobrada com gota citoplasmática (18,7%), classificando este defeito como secundário.

Há algumas diferenças entre autores quanto à classificação de defeitos primários e secundários ou maiores e menores (QUEIROZ, 2003; TEBET, 2004; MORAIS et al., 2002). A recomendação do Manual do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998) é descrever os defeitos de cabeça, peça intermediária, peça principal, outros associados à cauda e outros elementos, todos

com suas subdivisões, conforme descrita por BLOM (1973).

TABELA 10 - MORFOLOGIA ESPERMÁTICA EM GATO-DO-MATO-PEQUENO (*Leopardus tigrinus*) MÉDIA (\pm EPM) RESULTANTE DE 32 AMOSTRAS PROVENIENTES DE 11 ANIMAIS

	Médias (%)
Espermatozóides normais	55,86 \pm 3,3
Defeitos maiores	
Cabeça contorno anormal	2,45 \pm 0,5
Cabeça delgada	1,70 \pm 0,4
Cabeça gigante	1,11 \pm 0,2
Cauda enrolada na cabeça	1,41 \pm 0,2
Cauda fortemente dobrada/enrolada	13,17 \pm 2,3
Defeito de acrosso	2,24 \pm 0,4
Defeito em peça intermediária	5,05 \pm 0,8
Gota citoplasmática proximal	1,98 \pm 0,4
Microcefalia	0,23 \pm 0,1
Teratogênicos	0,82 \pm 0,7
Total de defeitos maiores (%)	30,15 \pm 2,8
Defeitos menores	
Cabeça isolada	3,12 \pm 0,6
Cauda dobrada c/ gota	1,32 \pm 0,4
Cauda dobrada/enrolada	5,35 \pm 0,6
Gota citoplasmática distal	3,26 \pm 1,1
Inserção anormal	0,94 \pm 0,2
Total de defeitos menores (%)	13,98 \pm 1,2

Para simplificar a classificação, as alterações dividem-se em defeitos maiores: certos tipos de anormalidades de cabeça, defeitos de acrossomos, cabeça

solta anormal, defeitos de peça intermediária, gota proximal, e *pouch formation*. Nos defeitos menores enquadram-se: certos tipos de cabeças anormais, acrossomo destacado, inserção anormal, gota distal e cauda dobrada (BLOM, 1973).

Gatos submetidos a eletroejaculações repetidas continuam a produzir comparável número de espermatozóides pleiomórficos, indicando que a frequência de eletroejaculações não produz efeito na morfologia espermática (HOWARD, 1986).

A dieta dos animais descrita anteriormente no item material e métodos está correta, segundo SWANSON et al. (2003), que indicaram como adequada a dieta contendo carne, carcaças de animais, órgãos e suplementação vitamínica e mineral.

Analises de regressão múltipla indicam que a dieta não teve influência nas análises reprodutivas de pequenos felídeos (SWANSON et al., 2003).

Já QUEIROZ (2003) cita que o mesmo indivíduo, mantido sob diferentes condições de manejo ou tendo seu sêmen avaliado por examinadores distintos, tende a apresentar maior variação nos defeitos ditos secundários do que naqueles classificados como primários.

Neste trabalho foi observado que, quanto ao percentual de espermatozóides pleiomórficos, a variação entre os indivíduos (CV 34,3%) foi bem maior que as variações entre as colheitas no mesmo indivíduo (CV 21,2%), sugerindo que o pleiomorfismo é relativamente constante no mesmo indivíduo.

A despeito da comparativamente alta incidência de teratospermia em felídeos, ainda há poucas informações sobre as causas ou implicações funcionais desta característica (PUKAZHENTHI, 2001).

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO DO EXPERIMENTO 3 - CONGELAMENTO DE SÊMEN EM GATO-DO-MATO-PEQUENO (*Leopardus tigrinus*)

O presente trabalho realizou pesquisa com dois diluentes para criopreservação de sêmen, o Bioxcell® (IMV Technologies, L'Aigle, França) - (BIOX) e o Test Yolk Buffer® (Irvine Scientific, Santa Ana, CA, EUA) – (TYB), os quais ainda não haviam sido descritos para uso nesta espécie. Também foram testadas três curvas de resfriamento-congelamento, uma curva chamada Rápida (RAP), uma curva descrita por TEBET (2004) (TEB) e uma curva processada no equipamento TK-3000 (TK), ainda não descritas para o gato-do-mato-pequeno.

Foram realizadas 32 colheitas de sêmen em 11 animais, das quais 24 foram processadas para o teste de criopreservação em um ou mais protocolos, por atingirem o número mínimo de 10×10^6 espermatozóides móveis/ejaculado e um mínimo de 60% de motilidade progressiva de espermatozóides no ejaculado *in natura*.

O diluente TYB apresentou uma motilidade espermática média (\pm EPM) pós-descongelamento de $30,64 \pm 6,58$, superior ao diluente BIOX ($18,23 \pm 6,58$), entretanto elas se apresentaram estatisticamente similares ($p > 0,05$), porém o nível de significância ficou entre 5% e 10% ($p < 0,10$), indicando que há necessidade de aumentar a amostragem para caracterizar a tendência de melhores resultados para TYB.

Quando se considera o percentual de queda do índice de motilidade progressiva (IMP, valores negativos) dos momentos *in natura* e pós-congelado, como medida de avaliação, os resultados de médias (\pm EPM) dos diluentes TYB ($-66,71 \pm 4,51$) e BIOX ($-54,65 \pm 7,21$) são estatisticamente similares ($p > 0,10$) (Gráfico 9).

Na avaliação entre as curvas de resfriamento-congelamento, considerando o percentual de queda do IMP dos momentos *in natura* e pós-congelado, os resultados de médias foram similares RAP ($-67,92 \pm 4,70$), TEB ($-62,52 \pm 7,30$) e TK ($-57,93 \pm 6,57$) ($p > 0,10$) (Gráfico 10). Observa-se uma queda significativa do Índice de motilidade progressiva (IMP) após o congelamento nas três curvas de resfriamento-

congelamento (Gráfico 8).

GRÁFICO - 7 MOTILIDADE ESPERMÁTICA PÓS-DESCONGELAMENTO

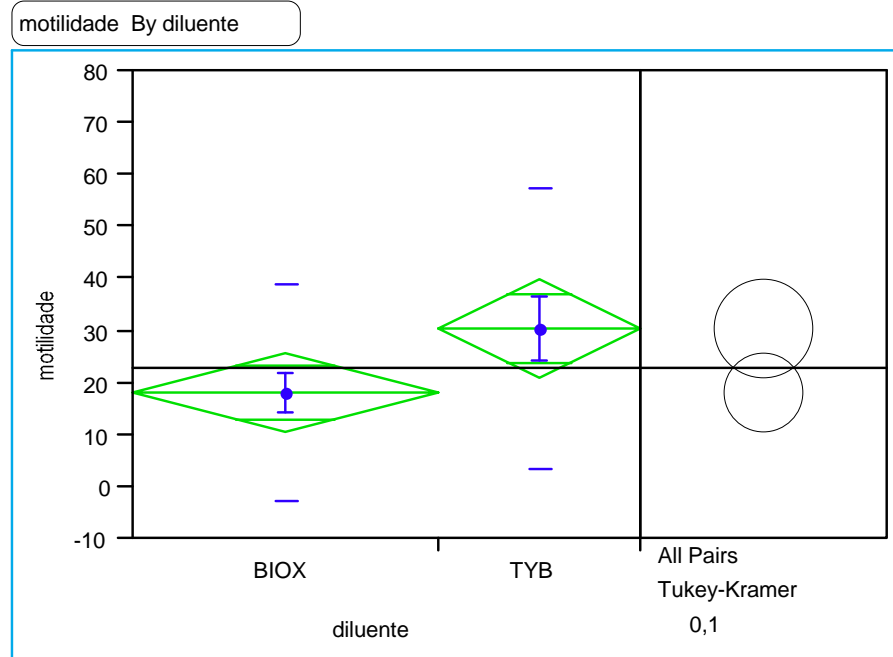
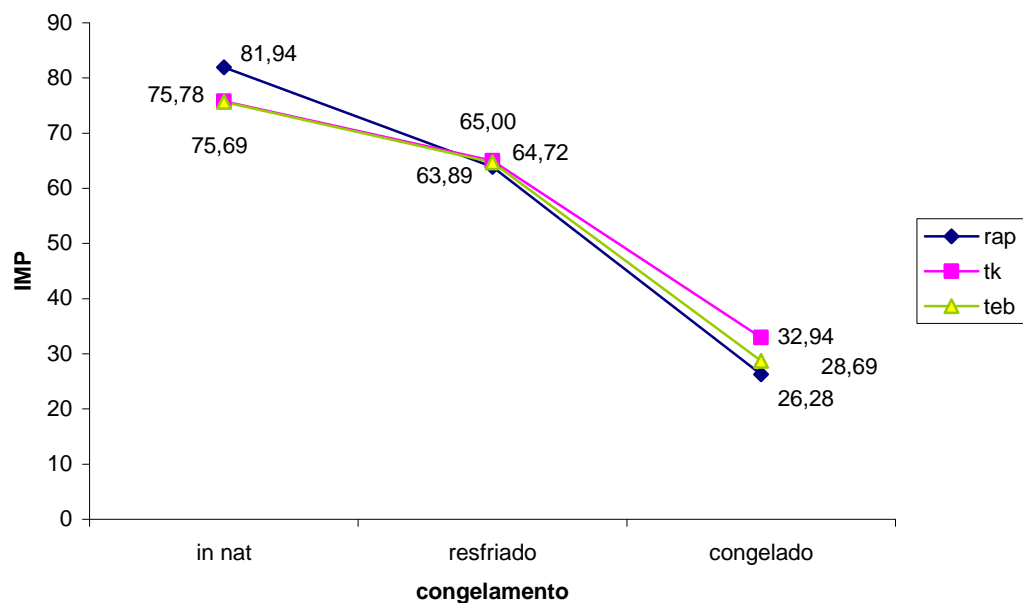


GRÁFICO - 8 ÍNDICE DE MOTILIDADE PROGRESSIVA (IMP) NOS MOMENTOS *IN NATURA*, RESFRIADO E DESCONGELADO, DAS CURVAS TESTADAS RAP (20°C A 5°C EM 60 MIN.; ESTABILIZAÇÃO EM 5°C POR 150 MIN E 5 A -196°C EM 3 MIN), TEB (20°C A 5°C EM 60 MIN; ESTABILIZAÇÃO EM 5°C POR 150 MIN E 5°C A -196°C EM 20 MIN.) E TK (20°C A 5°C EM 60 MIN.; ESTABILIZAÇÃO EM 5°C POR 90 MIN; 5 A -120°C EM 6,25 MIN E -196°C EM 1 MIN)



Embora não se tenha encontrado, estatisticamente, diferenças nos resultados entre as curvas ($p>0,10$), houve uma tendência da curva TK para melhores resultados. Esta curva apresenta decréscimos de temperatura mais lentos quando comparada às outras duas (Material e Métodos). Outro fator a considerar é o processo automatizado do equipamento, havendo interferência mínima, tanto humana quanto ambiental na operação.

GRÁFICO - 9 PERCENTUAL DE QUEDA DO IMP ENTRE OS DILUENTES TYB E BIOX

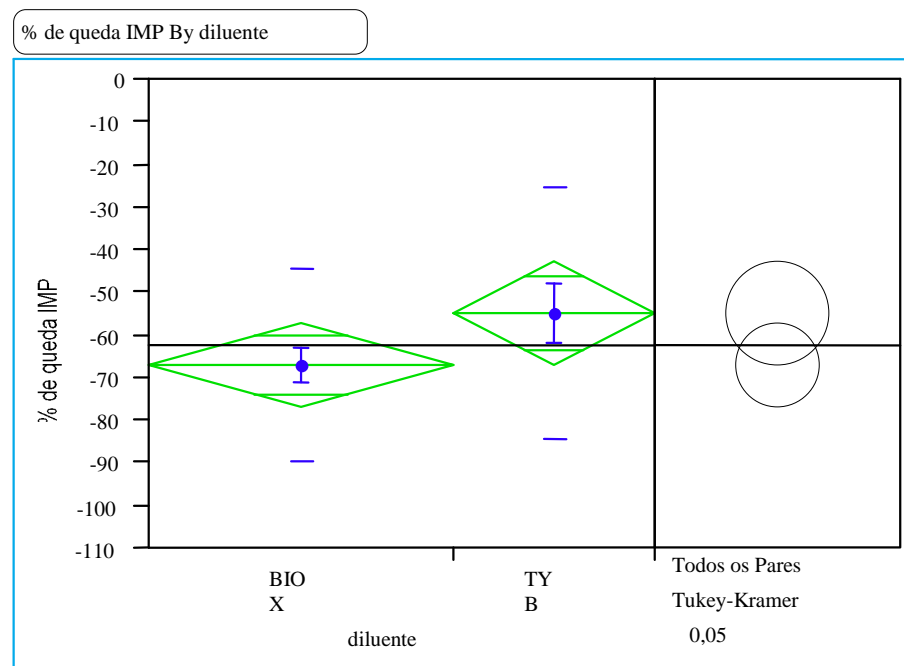
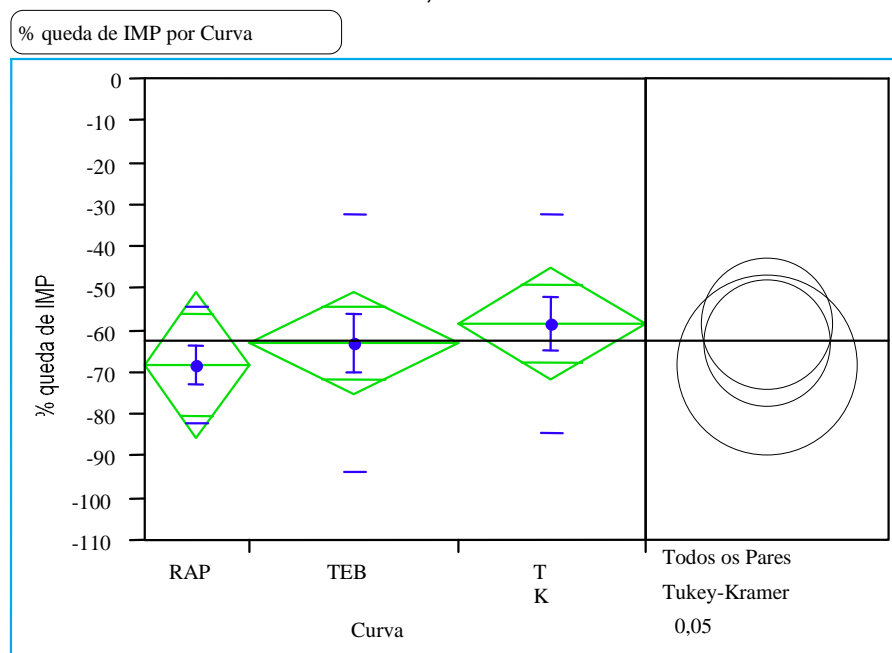


GRÁFICO - 10 PERCENTUAL DE QUEDA DO IMP ENTRE AS CURVAS DE CONGELAMENTO RAP,TEB E TK



Considerando a motilidade progressiva espermática média após o descongelamento, nos testes das curvas de resfriamento-congelamento e diluentes, encontramos a associação diluente BIOX - curva RAP como a menor média ($12,55 \pm 3,50$) e a associação diluente TYB – curva TK como a melhor média ($38,50 \pm 12,40$). Na análise estatística usando ANOVA, o teste Tukey-Kramer mostrou resultados que se configuraram similares entre todas as associações de curva/diluente testadas ($p > 0,10$). Só foi evidenciada diferença entre estas duas curvas (BIOX-RAP e TYB-TK) aplicando o teste t-Student com $\alpha > 0,05$, as demais associações diluentes – curvas também foram iguais neste teste (Gráfico 11). Para o vigor espermático, nas amostras descongeladas, não foi identificada diferença estatística ($p > 0,10$) entre as associações diluente-curva de congelamento (Gráfico 12).

GRÁFICO - 11 MOTILIDADE PROGRESSIVA ESPERMÁTICA EM PERCENTUAL, DAS AMOSTRAS DESCONGELADAS PARA AS ASSOCIAÇÕES BIOX-RAP, BIOX-TEB, BIOX-TK, TYB-TEB E TYB-TK

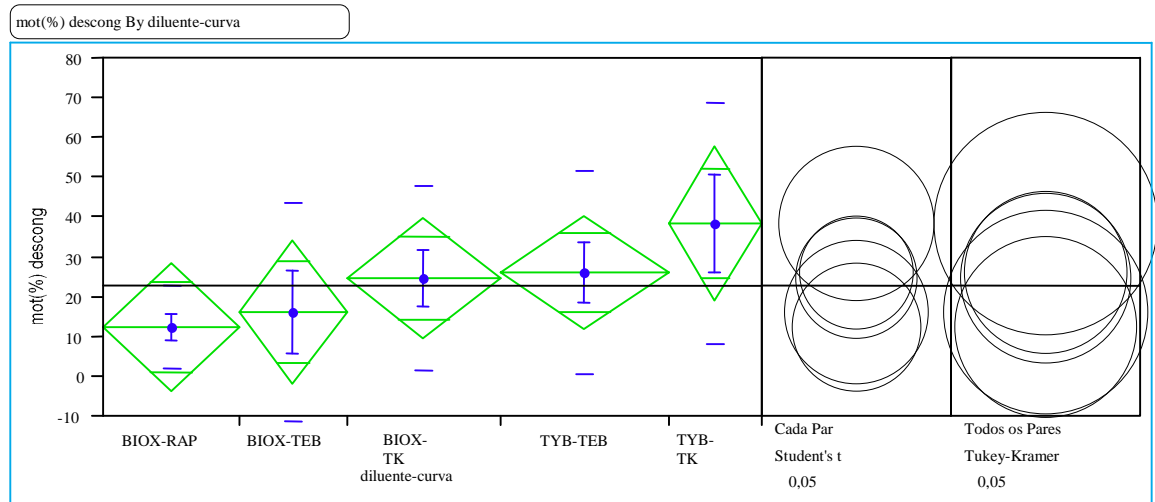


GRÁFICO - 12 VIGOR ESPERMÁTICO DAS AMOSTRAS DESCONGELADAS PARA AS ASSOCIAÇÕES BIOX-RAP, BIOX-TEB, BIOX-TK, TYB-TEB E TYB-TK

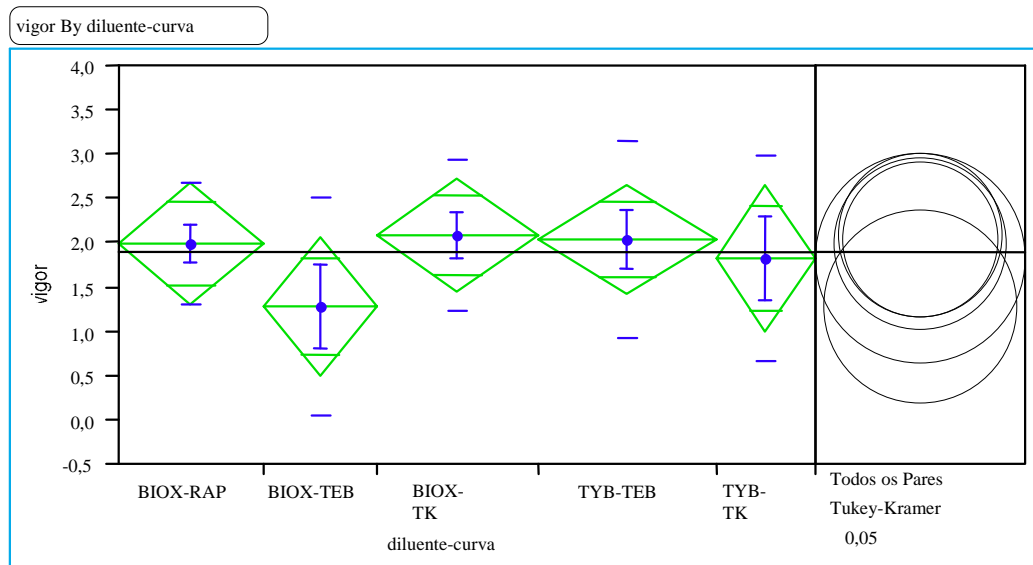


GRÁFICO - 13 ÍNDICE DE MOTILIDADE PROGRESSIVA (IMP) DAS AMOSTRAS DESCONGELADAS PARA AS ASSOCIAÇÕES BIOX-RAP, BIOX-TEB, BIOX-TK, TYB-TEB E TYB-TK

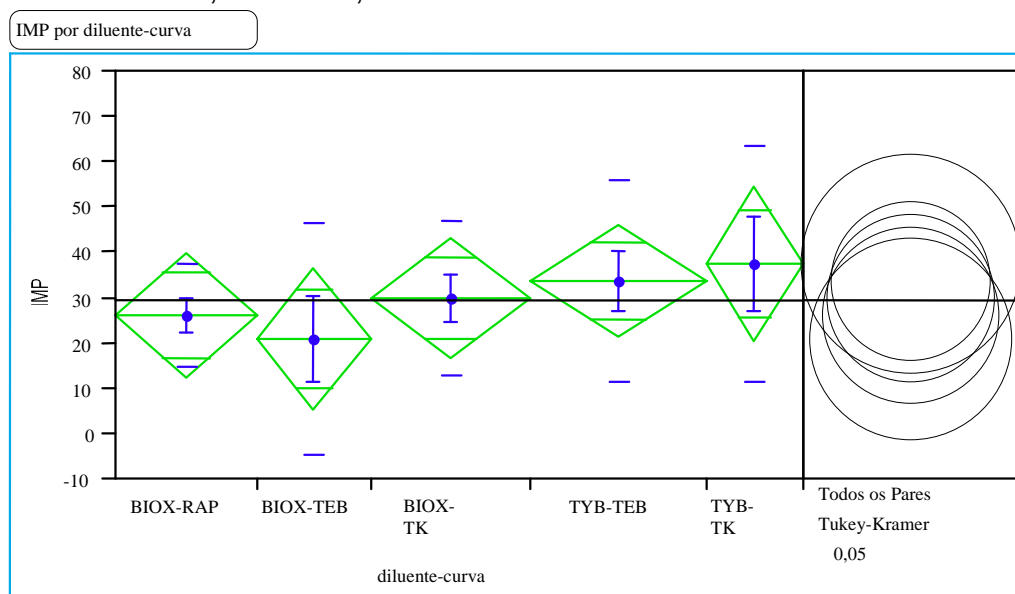


TABELA 11 - ÍNDICE DE MOTILIDADE PROGRESSIVA (IMP) PÓS-CONGELAMENTO POR AVALIAÇÃO INDIVIDUAL

Animal	n (amostras)	Média \pm EPM
GMP 05 ^a	8	56,62 \pm 5,86
GMP 02 ^{a b}	5	39,00 \pm 6,78
GMP 09 ^{a b}	3	37,50 \pm 6,61
GMP 07 ^{a b}	4	28,87 \pm 7,07
GMP 10 ^{a b}	4	27,63 \pm 6,50
GMP 01 ^{a b}	3	27,00 \pm 16,50
GMP 06 ^{a b}	5	25,10 \pm 9,04
GMP 04 ^b	1	10,50
GMP 12 ^b	2	5,25 \pm 5,25
GMP 08 ^b	2	0,00 \pm 0,00

Um dado importante a ressaltar é que analisando os resultados de pós-congelamento, mensurados em IMP entre os indivíduos (GMP 01 ao GMP 12) encontra-se diferença significativa ($p < 0,05$) nas médias. O animal GMP 05 apresentou a melhor média de IMP pós-congelamento ($56,62 \pm 5,86$), indicando que há fatores individuais nos resultados de criopreservação de sêmen (Tabela 11).

ZAMBELLI et al. (2002) compararam cinco curvas de congelamento para sêmen felino e encontraram diferenças entre as curvas, com resultados melhores e significativos para a curva de congelamento mais lenta, que apresentava decréscimo de $3,85^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

Finalmente, comparado à descrição de TEBET (2004), que trabalhou com cinco animais e na qual a motilidade espermática pós-congelamento foi de $37,69 \pm 12,5$ para um diluente e $27,52 \pm 13,2$ para outro diluente, os valores finais das análises de criopreservação de sêmen ficaram um pouco abaixo do citado: $30,64 \pm 6,58$ para o TYB e $18,23 \pm 6,58$ para o BIOX mas, como foi evidenciado, trabalhou-se com um número maior de animais ($n=11$), fato que propiciou queda nas médias, em decorrência de alguns indivíduos apresentarem resultados de criopreservação seminal muito aquém do ideal. Quando avaliamos os cinco melhores animais, a média para motilidade espermática pós-congelamento, em todas as metodologias fica em $41,50 \pm 3,92$.

Estas análises indicam que os diluentes testados são aplicáveis na criopreservação de sêmen da espécie em questão e provavelmente também para outros felídeos selvagens, sendo de fácil manipulação, com custos acessíveis e disponíveis no mercado nacional.

CONCLUSÕES

Os experimentos descritos permitem concluir que:

- a) o protocolo anestésico envolvendo cloridrato de tiletamina/zolazepan na dose de 6,7 mg/kg associado ao cloridrato de xilazina nas doses variando de 0,67 mg/kg a 1,3 mg/kg, é eficaz e seguro para colheita de sêmen em *Leopardus tigrinus*.
- b) o sêmen de *Leopardus tigrinus* apresentou características esperadas para a espécie.
- c) os diluentes Bioxcell[®] (IMV Technologies, L'Aigle, França) e Test Yolk Buffer[®] (Irvine Scientific, Santa Ana, CA, EUA) (TYB) foram eficazes para a criopreservação de sêmen em *Leopardus tigrinus*, sendo que o TYB apresentou melhores resultados ($p < 0,10$).
- d) considerando-se o número de amostras congeladas, não foi possível estabelecer diferenças significativas entre o uso do equipamento de congelação de sêmen TK-3000 e os métodos manuais de congelação de sêmen.
- e) existe variação individual nos resultados de criopreservação de sêmen intra-espécie.

REFERÊNCIAS

AMANN, R.P.; PICKETT, B.W. Principles of cryopreservation and review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Equine Vet. Sci.** v.7, p.143-73, 1987.

AZEVEDO, S. C; YOUNG, R. J. Treinamento de emas para evitar predadores: Uma estratégia conservacionista. **Science Press**. Disponível em: <http://www.sciencenet.com.br/backup/site_portugues/sciencepress/science49/scipress_49_emas.htm> Acessado em: 27/05/2005.

AXNÉR, E. **Mating and artificial insemination in domestic cats**. In: Simpson G, England GC, Harvey M (eds), British Small Animal Veterinary Association Manual of Small Animal Reproduction and Neonatology. p. 105-111. Cheltenham: BSVA, 1998.

AXNÉR, E.; LINDE-FORSBERG, C. Semen collection and assessment, and artificial insemination in the cat. In: CONCANNON, P.W., ENGLAND, G., VERSTEGEM, J., LINDE-FOSBERG. **Recent advances in small animal reproduction**. International Veterinary Information Service, Ithaca, New York, USA, 2002., Disponível em: <<http://www.ivis.org>> Acesso em: 15/08/2002

BLOM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defect and a proposal for a new classification. **Nord. Vet. Med.**, v.25, p.383-391, 1973.

BRANSON, K.R. Anestésicos injetáveis. In: **Farmacologia e terapêutica em medicina veterinária**, 8 ed. p. 179-223. ADAMS, H.R. Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro-RJ, 2003.

BRASIL. **Ministério do Meio Ambiente**. 2003. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/sbf/fauna/index.cfm>> Acesso em: 19/04/2005

CBRA. **Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal**. 2º ed. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. 1998.

CISTOLA A.M., GOLDER F.J., CENTONZE L.A., MCKAY L.W., LEVY J.K. Anesthetic and physiologic effects of tiletamine, zolazepam, ketamine, and xylazine combination (TKX) in feral cats undergoing surgical sterilization. **J Feline Med Surg**. 6(5):297-303, 2004.

COLLIER, G.E.; O'BRIEN, S.J. **A molecular phylogeny of the Felidae: immunological distance**. Evolution. p. 473-487, 1985.

CORREA, L.C.S. In: **Laboratório ambiental**. Ed. EDUNIOESTE, p.323, Cascavel-PR, 1999.

DONOGHUE, A.M.; BYERS, A.P.; JOHNSTON, L.A.; ARMSTRONG, D.L.; WILDT, D.E. Timing of ovulation after gonadotrophin induction and its importance to successful intrauterine insemination in the tiger (*Panthera tigris*). **J. Reprod Fertil**, p. 53-58, 1996.

FARSTAD, W. Current state in biotechnology in canine and feline reproduction. **Animal Reproduction Science**, 60-61, p. 375-87, 2000.

GIL, J., LUNDEHEIM, N., SODERQUIST, L., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Influence of extender, temperature, and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen. **Theriogenology**. 59(5-6):1241-55, 2003.

GOODROWE, K.L.; WALKER, S.L.; RYCKMAN, D.P.; MASTROMONACO, G.F.; HAY, M.A.; BATEMAN, H.L.; WADDELL, W.T. Piecing together the puzzle of carnivore reproduction. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, p. 389-403, 2000.

GROSS, M.E. Tranquilizantes, agonistas $\alpha 2$ -adrenérgicos e agentes relacionados. *In: Farmacologia e Terapêutica em Medicina Veterinária*. 8ª ed. p. 249-284. ADAMS, H.R. Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro-RJ, 2003.

HOWARD, J.G. Assisted reproduction techniques in carnivores. *In: Zoo and Wild Animal Medicine IV*, p. 449-457, Eds. ME Fowler and RE Miller. WB Saunders Co, Philadelphia, 1999.

HOWARD, J.G. Semen collection and analysis in nondomestic carnivores. *In: Zoo and Wild Animal Medicine III*, p. 390-399. Ed. ME Fowler. WB Saunders Co, Philadelphia, 1993.

HOWARD, J.G.; BARONE, M.A.; DONOGHUE, A.M.; WILDT, D.E. The effect of pre-ovulatory anaesthesia on ovulation in laparoscopically inseminated domestic cats. **Journal of Reproduction & Fertility**, p. 175-186, 1992.

HOWARD, J.G.; BUSH, M.; WILDT, D.E. Semen collection, analysis and cryopreservation in nondomestic mammals. *In: Morrow D (ed), Current Therapy in Theriogenology II*. Philadelphia: W.B. Saunders Co, p. 1047-1053, 1986.

LEIN, D.H. Male reproduction. *In: The Cat Diseases and Clinical Management*. v. 2, Robert G. Sherding. D.V.M.: New York, p. 1475-1477, 1989.

LENGWINAT, T.; BLOTTNER, S. In vitro fertilization of follicular oocytes of domestic cat using fresh and cryopreserved epididymal spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, p. 291-301, 1994.

LOPES, M.D. Biologia reprodutiva de felinos domésticos (*Felis catus*) e técnicas artificiais de reprodução. *In: Anais II Simpósio Paranaense de Atualização em*

Reprodução Animal e I Fórum ASBIA de Inseminação Artificial. Londrina Londrina:CBRA, 2002.

LUVONI, G.C., KALCHSCHMIDT, E., LEONI, S., RUGGIERO, C. Review: Conservation of feline semen Part I: Cooling and freezing protocols. **Journal of Feline Medicine and Surgery** 5, 203–208, 2003

MONTEIRO-FILHO, A.; LUCAS, S. R. R. Determinação dos parâmetros hematológicos de gatos-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*) mantidos em cativeiro. **12º Simpósio Internacional de Iniciação Científica USP**, Piracicaba, SP, 2004

MORAES, W.; MORAIS, R.N.; MOREIRA, N.; LACERDA, O.; GOMES, M.L.F.; MUCCIOLO, R.G.; SWANSON, W.F. Successful artificial insemination after exogenous gonadotropin treatment in the ocelot (*Leopardus pardalis*) and tigrina (*Leopardus tigrina*). **Proceedings American Association of Zoo Veterinarians**, p. 334-336, 1997.

MORAIS, R.N.; Reproduction in small felid males. In: Fowler, M. and Cubas, Z. **Biology, medicine, and surgery of South American wild animals**. Iowa state university press, Iowa, EUA, 2001.

MORAIS, R.N.; MOREIRA, N.; MORAES, W.; MUCCIOLO, R.G.; LACERDA, O.; GOMES, M.L.F.; SWANSON, W.F.; GRAHAM, L.H.; BROWN, J.L. Testicular and ovarian function in South American small felids assessed by fecal steroids. **Proceedings American Association of Zoo Veterinarians**, p. 561-565, 1996.

MORAIS, R.N.; MUCCIOLO, R.G.; GOMES, M.L.F.; LACERDA, O.; MORAES, W.; MOREIRA, N.; GRAHAM, L.H.; SWANSON, W.F.; BROWN, J.L. Seasonal analysis of semen characteristics, serum testosterone and fecal androgens in the ocelot (*Leopardus pardalis*), margay (*L. wiedii*) and tigrina (*L. tigrinus*). **Theriogenology**, p. 2027-2041. 2002.

MORAIS, R.N.; MUCCIOLO, R.G.; GOMES, M.L.F.; LACERDA, O.; MORAES, W.; MOREIRA, N.; SWANSON, W.F.; BROWN, J.L. Adrenal activity assessed by fecal corticoids and male reproductive traits in three South American felid species. **Proceedings American Association of Zoo Veterinarians**, p. 220-222, 1997.

MORATO, R. G.; GUIMARÃES, M. B.V.; NUNES, A. L. V.; CARCIOFI, A. C.; FERREIRA, F.; BARNABE, V. H.; BARNABE, R. C. Colheita e avaliação do sêmen em onça pintada (*Panthera onca*). **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v. 35, n. 4, p. 178-181, 1998

MOREIRA, N. **Reprodução e estresse em fêmeas de felídeos do gênero *Leopardus***. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Paraná. Curitiba: CPGZOO/UFPR, 2001.

MOREIRA, N.; MONTEIRO-FILHO, E.L.A.; MORAES, W.; SWANSON, W.F.; GRAHAM, L.H.; PASQUALI, O.L.; GOMES, M.L.F.; MORAIS, R.N.; WILDT, D.E.; BROWN, J.L. Reproductive steroid hormones and ovarian activity in felids of the *Leopardus* genus. **Zoo Biology**, p. 103-106, 2001.

NEUBAUER, K., JEWGENOW, K., BLOTTNER, S., WILDT, D. E., PUKAZHENTHI, B. S. Quantity rather than quality in teratospermic males: A histomorphometric and flow cytometric evaluation of spermatogenesis in the domestic cat (*Felis catus*) **Biology of Reproduction** 71 - 5 –p 1517-1524, 2004.

NOWELL, K.; JACKSON, P. Wild cats: status survey and conservation action plan. Gland: **IUCN World Conservation Union**, 1996.

OLIVEIRA, T.G. **Neotropical cats: ecology and conservation**. São Luís: EDUFMA, 1994.

OLIVEIRA, T.G. et al. Order Carnivora, Family Felidae (Cats). In: Fowler, M. and Cubas, Z. **Biology, medicine, and surgery of South American wild animals**. Iowa State University Press, Iowa, EUA, 2001.

PACHALY, J.R.; GIOSSO, M.A. The oral cavity. In: Fowler, M. & Cubas, Z. **Biology, medicine, and surgery of South American wild animals**. Iowa State University Press, Iowa, EUA, 2001.

PACHALY, J. R. ; BELETTINI, S. T. ; NEVES, A.e G. ; DELGADO, L. E. S. ; CIFFONI, E. M. G. Anesthesia of a margay (*Leopardus wiedii*) with allometrically scaled doses of tiletamine, zolazepam, xylazine and atropine - Case report. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da Unipar**, Umuarama, v. 5, n. 2, p. 333, 2002a.

PACHALY, J. R. ; MORAES, W. ; CIFFONI, E. M. G. ; LUCZINSKI, T. C. ; AVILA JR, R. H. Adverse reactions to tiletamine in *Leopardus tigrinus* (little spotted cat) - Case report. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da Unipar**, Umuarama, v. 5, n. 2, p. 331, 2002b.

PACHALY, J. R. ; MORAES, W. ; LUCZINSKI, T. C. ; AVILA JR, R. H. ; CIFFONI, E. M. G. Chemical restraint of the little spotted cat (*Leopardus tigrinus*) with allometrically scaled doses of tiletamine, zolazepam, xylazine and atropine. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da Unipar**, Umuarama, v. 5, n. 2, p. 339, 2002c

PACHALY, J.R. **Contenção da cutia *Dasaprocta azarae* (Rodenta:Mammalia), pela associação do cloridrato de cetamina, cloridrato de xilazina e sulfato de atropina – Definição de protocolos posológicos individuais com base em extrapolação alométrica interespecífica**. Curitiba, 1998 – Tese (Doutorado em zoologia) – Setor de Ciências Biológicas – Universidade Federal do Paraná. 1998.

PARANÁ. **Instituto Ambiental do Paraná**. 2004. Disponível em: <<http://celepar7.pr.gov.br/livrovermelho/index.asp?idgrupo=4&idmenu=VU&idespecie=242>> Acesso em 19/04/2005

PINEDA, M.H.; DOOLEY, M.P.; MARTIN, P.A. Long-term study on the effects of electroejaculation on seminal characteristics of the domestic cat. **Am J Vet Res**. 45(5):1038-41, 1984.

PLATZ, C.C.; WILDT, D.E.; SEAGER, S.W.J. Pregnancy in the domestic cat after artificial insemination with previously frozen spermatozoa. **J. Reprod Fertil**, p. 279-282, 1978.

POPE, C.E. Embryo technology in conservation efforts for endangered felids. **Theriogenology**, p. 163-174, 2000.

POPE, C.E. ZANG, Y.Z., DRESSER, B.L. A simple staining method for evaluating acrossomal status of cat spermatozoa. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**. 22(1), p 87-95. 1991

PUKAZHENTHI, B.; WILDT, D.E.; HOWARD, J.G. The phenomenon and significance of teratospermia in felids. **Journal of Reproduction and Fertility**, 57, p. 423-433, 2001.

PUKAZHENTHI, B.; LAROE, D., CROSIER, A., BUSH, L.M., SPINDLER, R., PELICAN, K.; HOWARD, J.G. WILDT, D. Challenges in cryopreservation of clouded leopard (*Neofelis nebulosa*) spermatozoa. **5 th International Symposium on Canine and Feline Reproduction**. São Paulo. Brazil, 2004.

PUKAZHENTHI, B.; PELICAN, K.; WILDT, D.; HOWARD, J.G. Sensitivity of domestic cat (*Felis Catus*) sperm from normospermic versus teratospermic donors to cold induced acrossomal damage. **Biology of Reproduction**. p. 135-141, 1999.

PUKAZHENTHI, B.; SPINDLER, R., WILDT, D., BUSH, L.M., HOWARD, J.G. Osmotic properties of spermatozoa from felids producing different proportions of pleiomorphisms: influence of adithing and removing cryoprotectant. **Cryobiology** 44, p. 288-300. 2002

QUEIROZ, V.S. **Estudo do efeito das condições de manipulação do sêmen de jaguatiricas (*Leopardus pardalis* Linnaeus, 1758) sobre a capacitação e a integridade morfológica e funcional dos espermatozoides**. (Dissertação de mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, 2003.

SANTOS, G.J.G.; MASSONE, F.; MATTOS JR, E.; TRINCA, L.A.; HATSCHBACH, E. Avaliação cardiovascular de cães submetidos a associações anestésicas fundamentada em fármacos dissociativos. **Medvep – Revista Científica de**

Medicina Veterinária. 2 (8) : 276-84 ,2004

SILVA A.R.; MORATO R. G. ; SILVA L. D.M. The potential for gamete recovery from non-domestic canids and felids. **Animal Reproduction Science.** 81 159–175, 2004.

SOJKA, N.J.; JENNINGS, L.L.; HAMNER, C.E. Artificial insemination in the cat (*Felis catus* L.) **Lab. Anim Care**, p. 194-204, 1970.

STABENFELDT, G.H.; EDQVIST, L. Processos reprodutivos do macho. *In: Dukes Fisiologia dos Animais Domésticos*, ed. Melvin J. Swenson. Texto original: Duke's physiology of domestic animals. 11º ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., p. 603-614, 1996.

SWANSON, W. F., JOHNSON, W. E., CAMBRE, R. C. et al. Reproductive status of endemic felid species in Latin American zoos and implications for ex situ conservation. **Zoo Biol**, vol. 22, p. 421–441, 2003.

SWANSON, W.F., BROWN, J.L. International training programs in reproductive sciences for conservation of Latin American felids. **Anim Reprod Sci.** Jul;82-83:21-34, 2004

SWANSON, W.F.; BROWN, J.L.; WILDT, D.E. Influence of seasonality on reproductive traits in the male Pallas'cat (*Felis manul*) and implications for captive management. **J. Zoo Wildl Med**, p. 234-240, 1996a.

SWANSON, W.F.; HOWARD, J.G.; ROTH, T.L.; BROWN, J.L.; ALVARADO, T.; BURTON, M.; STARNES, D.; WILDT, D.E. Responsiveness of ovaries to exogenous gonadotrophins and laparoscopic artificial insemination with frozen-thawed spermatozoa in ocelots (*Felis pardalis*). **Journal of Reproduction and Fertility**, p. 87-94, 1996b.

SWANSON, W.F.; WILDT, D.E. Strategies and progress in reproductive research involving small cat species. *In: The Zoological Society of London.* **Int Zoo Yb**, p. 152-159, 1997.

SWANSON, W.F.; WILDT, D.E.; CAMBRE, R.C.; CITINO, S.B.; QUIGLEY, K.B.; BROUSSET, D.; MORAIS, R.N.; MOREIRA, N.; O'BRIEN, S.J.; JOHNSON, W.E. Reproductive survey of endemic felid species in Latin American zoos: male reproductive status and implications for conservation. **Proc Amer Assoc Zoo Vet Ann Conf**, p. 374-380, 1995.

TEBET, M.J. (2004) **Efeito da criopreservação sobre a célula espermática em três espécies de felinos: O gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*), a jaguatirica (*Leopardus pardalis*) e o gato doméstico (*Felis catus*).** Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho" FMVZ. Botucatu, SP. 2004.

TSUTSUI, T.; TANAKA, A.; TAKAGI, Y. et al. Unilateral intrauterine horn insemination of frozen semen in cats. **J Vet Med Sci**, p. 1247-1251, 2000.

VAUGHAN J. GALLOWAY D.; HOPKINS D. Artificial insemination in alpacas (*Lama pacos*). **Rural Industries Research and Development Corporation**. Publication No. 03/104, Austrália, 2003.

WATSON, P.F, MARTIN, I.C. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**., v. 60-1, p. 481-92, 2000.

WATSON, P.F. Artificial insemination and preservation of the semen. *In*: **Marshall's Physiology of Reproduction**. 4 ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, v2, p747-869, 1990.

WILDT, D.E. Fertilization in cats. *In*: Dunbar BS & O'Rand M (eds), **A comparative overview of mammalian fertilization**. p. 299-324, New York: Plenum Press, 1991.

WILDT, D.E.; BUSH, M.; O'BRIEN, S.J. Training Manual: Reproduction, genetics and veterinary medicine. Front Royal: **Center for New Opportunities in Animal Health Sciences (NOAHS), Conservation and Research Center**, National zoo, Smithsonian Institution, 1993.

WILDT, D.E.; MONFORT, S.L.; DONOGHUE, A.M.; JOHNTON, LA.; HOWARD, J.G. Embryogenesis in conservation biology - or how to make an endangered species embryo. **Theriogenology**, p. 161-184, 1992.

WILDT, D.E.; ROTH, T.L. Assisted reproduction for managing and conserving threatened felids. **Int Zoo Yb**, p. 164-172, 1997.

ZAMBELLI, D.; CANEPPELE, B.; CASTAGNETTI, C. AND BELLUZZI, S. Cryopreservation of cat semen in straws: Comparison of five different freezing rates. **Reprod Dom Anim** 37, 310-313, 2002.